



**UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI NAPOLI “FEDERICO II”**

Dottorato di ricerca in

**Terapie Avanzate Biomediche e Chirurgiche**

Coordinatore: Prof. Giovanni Di Minno

**Ciclo XXXI**

***Valutazione dell’effetto del caffè decaffeinato sulla  
permeabilità intestinale in un modello murino di  
NAFLD***

*Tutor*

*Chiar.mo Prof.*

*Nicola Caporaso*

*Candidata*

*Dott.ssa Antonella Rossi*

Anno Accademico 2018/2019

## **INDICE**

<b>ABSTRACT .....</b>	<b>3</b>
<b>1. INTRODUZIONE .....</b>	<b>8</b>
<b>1.1 NAFLD.....</b>	<b>8</b>
<b>1.2 EZIOPATOGENESI .....</b>	<b>9</b>
<b>1.3 MICROBIOTA INTESTINALE .....</b>	<b>12</b>
<b>1.4 “GUT-LIVER AXIS” E PERMEABILITÀ INTESTINALE .....</b>	<b>14</b>
<b>2. IL CAFFÈ .....</b>	<b>16</b>
<b>2.1 COMPOSIZIONE CHIMICA DEL CAFFÈ .....</b>	<b>16</b>
<b>2.3 CAFFÈ E STEATOSI .....</b>	<b>19</b>
<b>3. SCOPO DELLA TESI.....</b>	<b>22</b>
<b>4. MATERIALI E METODI .....</b>	<b>23</b>
<b>4.1 MODELLO SPERIMENTALE DI STEATOSI EPATICA .....</b>	<b>23</b>
<b>4.2 DETERMINAZIONE DEI PARAMETRI EMATOCHIMICI DI DANNO METABOLICO ED EPATICO.....</b>	<b>25</b>
<b>4.3 ANALISI ISTOLOGICA E VALUTAZIONE DEL GRADO DI STEATOSI EPATICA .....</b>	<b>25</b>

<b>4.4</b>	<b>ESTRAZIONE DI RNA E REAL TIME PCR IN CAMPIONI DI TESSUTO EPATICO E INTESTINALE .....</b>	<b>26</b>
<b>4.5</b>	<b>COMPOSIZIONE DEL MICROBIOTA INTESTINALE.....</b>	<b>30</b>
<b>4.6</b>	<b>COMPOSIZIONE LIPIDICA DEL CONTENUTO CECALE .....</b>	<b>30</b>
<b>4.7</b>	<b>ANALISI STATISTICA.....</b>	<b>32</b>
<b>5.</b>	<b>RISULTATI .....</b>	<b>33</b>
<b>5.1</b>	<b>ADERENZA ALLA DIETA NEL MODELLO SPERIMENTALE .....</b>	<b>33</b>
<b>5.2</b>	<b>VALUTAZIONE DEI PARAMETRI METABOLICI .....</b>	<b>35</b>
<b>5.3</b>	<b>ANALISI ISTOLOGICA E VALUTAZIONE DEL GRADO DI STEATOSI EPATICA .....</b>	<b>36</b>
<b>5.4</b>	<b>FATTORI EPATICI ALLA BASE DELLA DEPOSIZIONE DEL GRASSO.....</b>	<b>39</b>
<b>5.5</b>	<b>FATTORI EPATICI E INTESTINALI ALLA BASE DELL'EFFLUSSO DI COLESTEROLO .....</b>	<b>40</b>
<b>5.6</b>	<b>FATTORI INTESTINALI IMPLICATI NEL SENSING DEI LIPIDI E NEL METABOLISMO ENERGETICO.....</b>	<b>42</b>
<b>5.7</b>	<b>PERMEABILITÀ INTESTINALE E MICROBIOTA .....</b>	<b>46</b>
<b>6.</b>	<b>DISCUSSIONE .....</b>	<b>52</b>
<b>7.</b>	<b>BIBLIOGRAFIA .....</b>	<b>60</b>

## ABSTRACT

Negli ultimi due decenni, vari studi *in vitro* e *in vivo* hanno valutato gli effetti epatoprotettivi del caffè e dei suoi componenti. In un precedente lavoro abbiamo dimostrato che il danno epatico, indotto da una dieta ad alto contenuto di grassi (HFD), viene ripristinato dal consumo di caffè attraverso una riduzione della deposizione di grasso nel fegato ed un miglioramento dello stato antiossidante e antinfiammatorio.

Col presente studio ci siamo proposti di valutare il possibile coinvolgimento dell'intestino nella NAFLD e l'efficacia del consumo di caffè nel modulare il metabolismo dei lipidi, di influenzare le funzioni di barriera intestinale e la composizione del microbiota.

Ai fini dello studio sono stati utilizzati 24 topi C57BL/6J suddivisi in 3 gruppi di trattamento: dieta standard (SD); HFD; HFD con soluzione di caffè decaffeinato (HFD + COFFEE) per 12 settimane. Al termine dello studio è stata effettuata la valutazione dei livelli sierici di colesterolo totale, ALT, trigliceridi e glucosio. Inoltre, su tessuto epatico è stata effettuata l'analisi istologica e mediante RT-PCR è stata effettuata la valutazione dell'espressione genica di PPAR- $\alpha$ , ACOX-1 e LXR- $\alpha$  mentre nel duodeno e nel colon è stata valutata l'espressione genica dei mediatori molecolari del metabolismo degli acidi grassi e della permeabilità intestinale. Sono stati raccolti campioni fecali per l'analisi degli acidi grassi e la composizione del microbiota intestinale.

Il trattamento con caffè ha ridotto i livelli sierici di colesterolo, glucosio e ALT e ha migliorato la steatosi macrovescicolare. Rispetto al gruppo HFD, i dati mostrano che la somministrazione di caffè up-regola l'espressione di PPAR- $\alpha$ , ACOX-1 e LXR- $\alpha$  nel fegato ( $p < 0,05$  in tutti i casi), up-regola l'espressione di ABCA1 e ABCG1 nel duodeno ( $p < 0,05$  in entrambi i casi) e FFAR-1 nel duodeno e nel colon ( $p < 0,05$  in entrambi i casi). Rispetto ai topi HFD, gli HFD + COFFEE presentano nel cieco una percentuale più elevata di lipidi non digeriti, principalmente sotto forma di trigliceridi. Inoltre, i topi HFD + COFFEE mostrano una maggiore espressione di zonulina-1 nel duodeno e nel colon ( $p < 0,05$ ), claudina e PYY nel duodeno ( $p < 0,05$  in tutti i casi) e una maggiore abbondanza di Alcaligenaceae nelle feci ( $p < 0,05$ ). I topi HFD + COFFEE presentano un apporto calorico paragonabile all'HFD ma a partire dall'ottava settimana di intervento l'incremento del peso corporeo si riduce.

La supplementazione di caffè nei topi HFD previene la NAFLD e determina una riduzione della deposizione di grasso epatico mediante l'aumento dell'ossidazione dei grassi nel fegato, la riduzione del colesterolo circolante attraverso l'attivazione dell'efflusso di colesterolo intestinale, la regolazione del metabolismo energetico e la riduzione della permeabilità intestinale. I benefici metabolici indotti dal caffè sono stati accompagnati da un trascurabile cambiamento della composizione del microbiota intestinale.

## **ABBREVIAZIONI**

ABCA1: ATP-Binding Cassette Transporter A1

ABCG1: ATP-Binding Cassette Transporter G1

ACOX1: Acyl-CoA Oxidase 1

ALT: Alanine Aminotransferase

ANOVA: Analysis Of Variance

ApoA-I: Apolipoprotein A1

CCK: CholeCystoKinin

CGA: Chlorogenic Acid

Ct: Cycle Threshold

CTGF: Connective Tissue Growth Factor

FFA1: Free Fatty Acid 1

FFAR1: Free Fatty Acid Receptor 1

FFAR3: Free Fatty Acid Receptor 3

GIP: Glucose-Dependent Insulinotropic Polypeptide

GLP-1: Glucagon-like peptide 1

GLUT4: Glucose Transporter 4

GPR40: G-protein coupled receptor 40

H&E: Hematoxylin And Eosin Stain

HCC: Hepato Cellular Carcinoma

HDL: High Density Lipoprotein

HFD + COFFEE: High Fat Diet + Decaffeinated Coffee

HFD: High Fat Diet

HRMS: High Resolution Mass Spectrometry

IL-8: Interleuchin L-8

IP: Intestinal Permeability

IR: Insulin Resistance

LBO: Whole Grain Oat Flour With Low Bran Content

LCFA: Long-Chain Fatty Acids

LDL-R: The Low-Density Lipoprotein (LDL) Receptor

LPS: Lipopolysaccharide

LXR $\alpha$ : Liver X Receptor Alpha

LXR $\beta$ : Liver X Receptor Beta

NAFLD: Non-Alcoholic Fatty Liver Disease

NASH: Non-Alcoholic Steatohepatitis

NCBI: National Center for Biotechnology Information

PCA: Principal Components Analysis

PCR-hs: High-Sensitivity C-Reactive Protein

PPAR $\alpha$ : Peroxisome Proliferator-Activated Receptor Alpha

PPAR $\beta$  /  $\delta$ : Peroxisome Proliferator-Activated Receptor Beta Or Delta

PPAR $\gamma$ : Peroxisome Proliferator-Activated Receptor Gamma

PYY: Peptide YY

PP: Pancreatic polypeptide

RAS: Renin-Angiotensin System

RCT: Reverse Cholesterol Transport

RNS: Reactive Nitrogen Species

ROS: Reactive Oxygen Species

RT/PCR: Reverse Transcriptase-Polymerase Chain Reaction

SBBO: Small Bowel Bacterial Overgrowth

SCFA: Short Chain Fatty Acids

SD: Standard Diet

SEM: Standard Error Of The Mean

SM: Metabolic Syndrome

SRA: Sequence Read Archive

SREBP-2: Sterol Regulatory Element Binding Protein -2

TGF- $\beta$ : Transforming Growth Factor-beta

TJ: Tight Junctions

TLR-4: Toll-like receptor-4

TNF- $\alpha$ : Tumor Necrosis Factor-alfa

UGT: Uridine Diphosphate-Glucuronosyltransferase

WAT: White Adipose Tissue

WGO: Whole Grain Oat Flour

ZO-1: Zonula occludens-1



# 1. INTRODUZIONE

## 1.1 NAFLD

La steatosi epatica non alcolica (Non-Alcoholic Fatty Liver Disease, NAFLD) è considerata come la manifestazione epatica della “sindrome metabolica” (SM). La NAFLD, associata all’elevata incidenza di obesità e diabete di tipo 2, rappresenta l’epatopatia cronica più comune negli adulti e nella popolazione pediatrica dei Paesi industrializzati. Approssimativamente, il 10-20% dei casi di NAFLD sviluppa steatoepatite non alcolica (Non-Alcoholic Steatohepatitis, NASH)<sup>1</sup>, il 10-15% dei casi di NASH progredisce in cirrosi, che aumenta drasticamente l’incidenza del carcinoma epatocellulare (Hepato Cellular Carcinoma, HCC)<sup>2</sup>. La NAFLD, nello specifico, si è notevolmente diffusa nei Paesi occidentali con una prevalenza che si aggira intorno al 25-30% nella popolazione generale, al 30-50% nei soggetti diabetici, arrivando fino al 90% nei pazienti con iperlipidemia<sup>3</sup> e si prevede che diventi l’indicazione più frequente per il trapianto di fegato entro il 2030<sup>4</sup>. Negli ultimi dieci anni, l’evidenza che la NAFLD contribuisca attivamente all’aggravamento delle malattie cardiovascolari, del diabete di tipo 2 e della malattia renale cronica è diventata sempre più solida. Pertanto, tra medici e ricercatori è emerso un forte consenso a considerare la NAFLD come una malattia multi sistemica<sup>4</sup>. In considerazione dell’alta prevalenza della NAFLD nella popolazione generale e delle sue potenziali implicazioni cliniche, appare quindi di prioritaria importanza la precoce e corretta identificazione dei soggetti ad alto rischio, al fine di

sorvegliare e predire prospetticamente l'insorgenza di complicanze che ne influenzano la prognosi epatica ed extra-epatica.

## **1.2 EZIOPATOGENESI**

L'acronimo NAFLD definisce uno spettro di alterazioni istologiche epatiche caratterizzate da un iperaccumulo di grasso intraepatocitario (steatosi), in particolare di trigliceridi >5%, in assenza di consumo alcolico significativo (cut-off di 20 g/die nella donna, 30 g/die nell'uomo) e cause secondarie di epatopatia. Le principali condizioni che determinano accumulo di grasso nel fegato, oltre all'alcol, sono: disordini e/o alterazioni di tipo nutrizionale (malnutrizione proteico-calorica, nutrizione parenterale totale, rapida perdita di peso corporeo, chirurgia gastrointestinale per l'obesità); tossicità da farmaci (corticosteroidi, estrogeni, antinfiammatori non steroidei, amiodarone, tamoxifene ecc); disordini di tipo metabolico congeniti e acquisiti (diabete, dislipidemia, obesità, sindrome metabolica); disordini metabolici congeniti (galattosemia, glicogenosi, abetalipoproteinemia, malattia di Wolman o deficit di enzima LAL)<sup>5</sup>.

Il disordine metabolico, riscontrabile costantemente nelle diverse condizioni patologiche, è rappresentato da un'alterazione dell'equilibrio del metabolismo lipidico a favore della lipogenesi rispetto alla lipolisi. Questa condizione si può verificare per aumento della sintesi degli acidi grassi e/o per un loro ridotto smaltimento per deficit della  $\beta$ -ossidazione, o per deficit della sintesi dei fosfolipidi o degli esteri del colesterolo, o per ridotta eliminazione degli acidi grassi dall'epatocita. L'accumulo di trigliceridi che ne deriva rappresenta il corrispettivo istologico e biochimico della steatosi<sup>6</sup>.

È ampiamente dimostrato, inoltre, che l'accumulo di trigliceridi negli epatociti è la diretta conseguenza metabolica di una ridotta sensibilità cellulare agli effetti dell'insulina, condizione definita come Insulino-Resistenza (IR). L'IR sembra avere un ruolo chiave nella patogenesi della NAFLD; il suo ruolo si estrinseca grazie alla capacità di favorire l'accumulo di grasso negli epatociti sia aumentando la lipolisi periferica, sia bloccando o diminuendo la  $\beta$ -ossidazione mitocondriale<sup>7</sup>.

L'esatto evento che determina l'innescò della componente necro-infiammatoria in un fegato steatosico che conduce dalla semplice steatosi verso la NASH, non è stato ancora definitivamente identificato. È verosimile che diversi fattori, agendo contemporaneamente o in successione cronologica, possano favorire la comparsa d'infiammazione, necrosi ed evoluzione fibrotica della malattia<sup>6</sup>. La digestione e l'assorbimento dei macronutrienti (principalmente lipidi e glucosio), il loro utilizzo e accumulo nel fegato e in altri tessuti (come il tessuto adiposo), l'assorbimento del glucosio e la sensibilità all'insulina, la composizione del microbiota intestinale, i metaboliti microbici (come gli acidi grassi a catena corta o gli acidi biliari secondari), lo stato infiammatorio e la permeabilità intestinale sono tutti fattori associati tra loro e che modulano lo stato di salute del fegato<sup>8</sup>.

Per spiegare lo sviluppo della NAFLD e la progressione di quest'ultima verso la NASH, fu proposta più di 10 anni fa la teoria che identificava due distinti momenti (teoria dei "two hits" da Day et al<sup>9</sup>). Tale teoria risulta ormai superata, in quanto è stato chiarito che il secondo "hit" non si identifica in un unico fattore, ma è l'insieme di più fattori. Matura, infatti, una nuova teoria, la "multiple parallel hit theory"<sup>10</sup>, che come "first hit" considera sempre l'accumulo di lipidi nell'epatocita e

l'IR, mentre scompone in tanti fattori il "second hit", che si identifica in: 1) stress ossidativo e conseguente perossidazione lipidica, 2) rilascio di citochine pro-infiammatorie (TNF- $\alpha$ , Tumor Necrosis Factor-alfa; TGF- $\beta$ , transforming growth factor-beta e IL-8, Interleuchin L-8) e di adipochine, e 3) disfunzioni mitocondriali. Tale teoria sottolinea, inoltre, che lo stress ossidativo ha un ruolo chiave nel meccanismo della progressione della steatosi a steatoepatite, mentre i fattori genetici e ambientali contribuiscono a tale meccanismo perché aumentano la produzione di ossigeno reattivo e/o di specie radicaliche (ROS e/o Reactive Nitrogen Species, RNS). Infatti, il meccanismo biomolecolare che innesca il processo infiammatorio tissutale, la necrosi epatocitaria e la fibrogenesi è legato ad un'alterazione dello stato ossidativo con aumentata produzione di specie reattive dell'ossigeno (ROS). In particolare, l'accumulo di trigliceridi negli epatociti è un forte induttore per l'attivazione delle lipossigenasi mitocondriali che portano alla produzione di radicali liberi. Questi, a loro volta, agiscono attraverso il meccanismo della perossidazione lipidica e stimolando la produzione di citochine infiammatorie (TNF- $\alpha$ , TGF- $\beta$  e IL8), favoriscono la chemiotassi neutrofila, la necrosi e la sintesi di collagene. Altresì, la crescita batterica eccessiva, i cambiamenti nell'espressione genica e il sistema renina-angiotensina (RAS) sono considerati anch'essi come importanti fattori nella patogenesi della steatosi epatica e dell'infiammazione<sup>11</sup>. In particolare, il microbiota intestinale sembra influire sulla patogenesi della NAFLD sia attraverso la produzione del lipopolisaccaride (LPS) e quindi la stimolazione della cascata delle citochine come il TNF- $\alpha$ , che attraverso la produzione in anaerobiosi di acetaldeide da piruvato con successiva riduzione ad etanolo<sup>12</sup>.

### 1.3 MICROBIOTA INTESTINALE

L'intestino umano rappresenta un ecosistema in cui trilioni di batteri convivono ed interagiscono con l'organismo ospite, rappresentando un "organo metabolico" capace di influenzare la regolazione di molte funzioni sistemiche, contribuire allo stato di salute, avere un ruolo in molte malattie gastrointestinali (colon irritabile, malattie infiammatorie croniche, diverticolite, cancro del colon) e sistemiche (allergie, obesità, diabete tipo 2, aterosclerosi)<sup>13-15</sup>. Il tratto gastrointestinale ospita tra 500 e 1000 differenti specie di batteri che mantengono in condizioni fisiologiche, una relazione simbiotica con l'ospite. Il numero di cellule batteriche è 10 volte superiore al numero delle cellule eucariotiche umane<sup>16</sup>. Le nuove tecnologie genetiche di studio della flora batterica, hanno permesso di identificare e studiare il "metaboloma", cioè il complesso superorganismo costituito dal genoma di microbiota ed ospite, e la sua influenza sullo stato di salute e di malattia. Lo sviluppo delle tecniche basate sul sequenziamento della subunità 16S dell'RNA ribosomiale ha facilitato l'identificazione e la classificazione dei batteri. Il microbioma, cioè il genoma batterico complessivo è 100 volte maggiore rispetto al genoma umano ed è principalmente rappresentato da Anaerobi. I batteri dominanti nell'uomo adulto appartengono a tre gruppi prevalenti: i Firmicuti gram positivi, i Bacteroidetes gram negativi e gli Actinobatteri gram positivi. Ai Firmicuti appartengono 200 generi tra cui i Lattobacilli, i Mycoplasmi, i Bacilli e i Clostridi. Ai Bacteroidetes appartengono 20 generi. La concentrazione dei microrganismi è molto alta nella cavità orale, ove consiste principalmente di anaerobi come

Prevotella, Peptostreptococchi, Bacteroidi, Fusobacterium ed Eubacterium mentre nello stomaco la popolazione batterica risulta essere scarsa a causa del pH estremamente acido presente nell'ambiente gastrico ed è rappresentata soprattutto da Lattobacilli, Streptococchi e Lieviti che risiedono nello strato di mucosa che riveste l'epitelio gastrico. Anche il duodeno ha una bassa popolazione microbica a causa del veloce tempo di transito e della secrezione di fluidi biliari e pancreatici che uccidono la maggior parte di batteri ingeriti, e per l'effetto dell'attività motoria propulsiva che impedisce la colonizzazione stabile del lume. Si osserva un progressivo aumento nel numero delle specie dal digiuno all'ileo (da 104 a 107), cominciando ad aumentare i gram negativi e gli anaerobi obbligati. Il colon presenta un complesso e dinamico ecosistema microbico con 10<sup>10</sup>-10<sup>12</sup> cellule/grammo o millilitro di contenuto luminale, costituito in maggioranza da anaerobi, particolarmente abbondanti nel cieco e nel colon destro a causa della grande disponibilità di substrati e del favorevole ambiente per la crescita batterica (basso tempo di transito, disponibilità pronta di nutrienti, pH favorevole etc.)<sup>17</sup>.

L'utilizzazione di energia dalla dieta da parte del microbiota porta ad accumulo di grasso e a disordini metabolici, ma non è noto il meccanismo attraverso cui avviene l'interazione tra i batteri intestinali, le malattie metaboliche correlate all'obesità e l'insorgenza di infiammazione di basso grado. L'infiltrazione dei macrofagi negli organi (tessuto adiposo, muscoli e fegato) potrebbe promuovere la secrezione di fattori pro-infiammatori<sup>18-21</sup>; tuttavia l'esatto ruolo di essi e la fonte e il tipo di fattori scatenanti che attivano il sistema immunitario rimangono oggetto di dibattito<sup>22</sup>. La dieta ricca di grassi ha effetto pro-infiammatorio legato agli acidi grassi: per esempio si ritiene che l'acido palmitico possa innescare la risposta

infiammatoria agendo tramite i recettori per il LPS, i Toll-like receptor-4 (TLR-4) presenti su adipociti e macrofagi, che contribuiscono alla infiammazione del tessuto adiposo nell'obesità<sup>23,24</sup>. Tuttavia, il collegamento diretto tra acidi grassi e TLR4 è stato criticato<sup>25</sup>, mentre sembra che il *primum movens* che lega la dieta all'infiammazione sia rappresentato dal lipopolisaccaride dei batteri gram negativi<sup>26,27</sup>. Infatti, un eccesso di grasso nella dieta non solo aumenta l'esposizione sistemica ad acidi grassi liberi pro-infiammatori, ma facilita lo sviluppo di endotossemia metabolica per aumento dei livelli plasmatici di LPS<sup>26</sup>. Il LPS può influenzare sia il metabolismo che il sistema immunitario, fornendo quindi la base all'ipotesi che il microbiota rappresenti una connessione funzionale tra vie metaboliche, immunità ed infiammazione<sup>28</sup>.

#### **1.4 “GUT-LIVER AXIS” E PERMEABILITÀ INTESTINALE**

L'intestino ed il fegato rappresentano un sistema interconnesso che ha diverse funzioni: assorbimento, metabolismo e destinazione di diverse sostanze nutritive. L'interconnessione tra questi due organi è deducibile dallo studio dell'anatomia. In particolare, il fegato riceve il sangue da un doppio sistema vascolare: il primo è l'arteria epatica che fornisce sangue ossigenato dalla circolazione generale; il secondo è la vena portale epatica che offre sangue non ossigenato dal piccolo intestino che non solo contiene sostanze nutritive, ma anche molecole segnale e prodotti batterici, come LPS, DNA batterico e peptidoglicani<sup>29</sup>. Pertanto il fegato, primo sito di filtrazione di questi prodotti, è anche il primo sito esposto ad essi. In caso di sovracrescita batterica intestinale (SIBO) e aumento della permeabilità intestinale (IP), come si osserva nei pazienti affetti da NAFLD ed in modelli animali

corrispondenti, il sistema epatobiliare è inevitabilmente esposto ad un livello elevato dei suddetti prodotti batterici, in grado così di attivare i recettori sulle superfici cellulari e dare avvio ad una cascata di segnali di trasduzione pro-infiammatori induttori di flogosi epatica e fibrosi<sup>30</sup>.

Lo studio di *Miele et al.*, evidenzia non solo che la NAFLD è associata all'*overgrowth* batterico, ma anche che essa si associa ad un aumento della permeabilità intestinale dovuto ad un processo di distruzione delle giunzioni strette (*tight junctions* (TJ)): maggiore è la permeabilità intestinale, maggiore appare il grado di severità della steatosi epatica<sup>31</sup>. Il danno è stato stimato valutando l'espressione di una specifica proteina, la Zonulina-1 (Zo-1), considerata un marker di integrità delle TJ. Nei pazienti con NAFLD l'espressione genica della Zo-1 a livello della mucosa duodenale è down-regolata rispetto a quella dei controlli sani<sup>31</sup>.

Il ruolo delle endotossine di derivazione microbica intestinale, specialmente di LPS, ed i loro pathways di segnale coinvolti nella progressione verso la NASH sono stati il focus di numerose ricerche scientifiche<sup>32,33</sup>. In tale ottica, diversi studi hanno evidenziato che, l'insieme dei fattori genetici e ambientali può portare ad una proliferazione batterica sproporzionata, a favore dei batteri Gram-negativi. Le endotossine prodotte da questi ultimi attraversano la mucosa intestinale, già danneggiata a livello delle *tight junctions*, finiscono nel flusso sanguigno, creando un circolo vizioso che scatenerrebbe una cascata necroinfiammatoria con conseguente danno al fegato<sup>34,35</sup>.



## **2. IL CAFFÈ**

Il caffè è una delle bevande più consumate al mondo. Esso comprende molteplici componenti che possono avere potenziali effetti benefici sulla salute. Diversi studi epidemiologici associano il consumo di caffè ad una ridotta incidenza di malattie croniche come il diabete, malattie cardiovascolari e neurodegenerative. Negli ultimi 20 anni, un crescente numero di studi epidemiologici e sperimentali hanno dimostrato gli effetti positivi del caffè sulle malattie croniche del fegato. Il caffè favorisce un miglioramento della steatosi epatica e della fibrosi, ed una riduzione della cirrosi e del rischio di epatocarcinoma. I meccanismi d'azione attraverso cui esercita i suoi effetti positivi, però, non sono pienamente compresi<sup>36,37</sup>.

### **2.1 COMPOSIZIONE CHIMICA DEL CAFFÈ**

Il caffè è apprezzato per il suo aroma e gusto, ed il suo uso è molto diffuso per le caratteristiche tonificanti e le proprietà eccitanti. Il caffè è una miscela complessa di circa 1000 composti. Sono presenti carboidrati, lipidi, proteine e minerali quali potassio e magnesio. Inoltre, il caffè è una ricca fonte di antiossidanti e di altri composti bioattivi come l'acido clorogenico, le melanoidine ed i diterpeni<sup>36</sup>.

Le proteine del caffè vanno incontro a sensibili cambiamenti durante la torrefazione, in quanto le alte temperature raggiunte le degradano parzialmente. In particolare il contenuto amminoacidico cala del 30%.

I carboidrati sono i maggiori costituenti del caffè e rappresentano circa il 50% del peso secco. Sono presenti polisaccaridi solubili ed insolubili in percentuale del 43-47% a seconda della varietà<sup>38</sup>.

La frazione lipidica del caffè non risente particolarmente della torrefazione. I trigliceridi rappresentano circa l'80% dei lipidi, seguiti da esteri diterpenici (circa il 15%), diterpeni (0,1%), esteri triterpenici (1,8%) e steroli (0,3%). Fra i diterpeni del caffè sono da ricordare il cafestolo e il kahweolo che sono, però, degradati in parte dalla torrefazione.

Il caffè è la principale fonte di acido clorogenico (CGA) nella dieta di molti paesi del mondo. Convenzionalmente per "acido clorogenico" si intende l'acido 5-caffeoilchinico il quale, per idrolisi, fornisce l'acido caffeico e chinico. Nel caffè sono presenti in forma libera anche l'acido ferulico e cumarico.

L'acido clorogenico è presente anche in forma di complesso con la caffeina: si stima, infatti, che il 10% della caffeina delle bevande a base di caffè sia presente in questa forma.

La caffeina, la teobromina e la teofillina sono le principali metil-xantine presenti nel caffè e in quanto tali, sono composti attivi in grado di influenzare differenti sistemi ed apparati (nervoso, cardio-circolatorio, renale, respiratorio).

Il consumo di una tazzina di caffè moka all'italiana porta all'ingestione di 125mg di caffeina; l'ingestione di oltre 1g comporta ansietà, insonnia, aritmie cardiache e disturbi gastrointestinali. Dei minerali, nel caffè predomina il potassio, seguito da magnesio, fosforo e calcio.

Le melanoidine sono composti che caratterizzano la frazione solubile del caffè torrefatto. Sono composti ad alto peso molecolare, derivanti dalle fasi avanzate delle reazioni di Maillard<sup>39,40</sup>. Esse sono responsabili del colore tipico del caffè e delle sue proprietà antiossidanti<sup>41-43</sup>.

È interessante notare che sia i polifenoli che le melanoidine arrivano, in parte, al colon e sono in grado di interagire con il microbiota locale, ragion per cui sono considerati i componenti del caffè con le maggiori possibilità di avere effetti<sup>44,45</sup>.

È del 2010 lo studio (*Vitaglione et al*)<sup>46</sup> condotto con lo scopo di analizzare gli effetti non solo del caffè decaffeinato in toto, ma anche dei suoi costituenti polifenoli e melanoidine, sulla progressione della NASH sperimentalmente indotta nel ratto. Da questo studio è emerso che il caffè protegge il fegato da danni causati da una dieta iperlipidica. Tale effetto è dovuto ad una riduzione:

- dell'accumulo di grasso nel fegato (attraverso un aumento della  $\beta$ -ossidazione degli acidi grassi);
- dello stress ossidativo sia a livello epatico che a livello sistemico (attraverso il sistema del glutathione);
- dell'infiammazione epatica (attraverso la modulazione dei geni).

Anche se la letteratura scientifica indica che la salute dell'intestino è implicata nello sviluppo e nella progressione delle malattie del fegato ed esistono scarse prove che il caffè possa modulare alcune funzioni intestinali, vi è ancora una lacuna sui meccanismi intestinali che sono implicati nell'effetto protettivo del consumo di caffè in soggetti con NAFLD.

## 2.3 CAFFÈ E STEATOSI

Gli esatti meccanismi con cui il caffè esercita i suoi effetti benefici sul fegato sono ancora oggetto di studio. Le proprietà antifibrotiche del caffè sono state osservate nei ratti, dove è stato dimostrato che il caffè protegge dalle lesioni epatiche indotte dalla tioacetammide, portando a riduzione della necroinfiammazione epatica e della fibrosi<sup>47,48</sup>. Ulteriori studi hanno suggerito che questo meccanismo è mediato dalla diminuzione dell'espressione del TGF- $\beta$  e del fattore di crescita del tessuto connettivo (CTGF)<sup>49</sup>. Un altro potenziale meccanismo mediante il quale il caffè esercita effetti epatoprotettivi è stato suggerito da uno studio giapponese, in cui il consumo di caffè è positivamente associato ai livelli di adiponectina e inversamente correlato ai livelli di leptina, della proteina C-reattiva ad alta sensibilità (PCR-hs) ed agli enzimi epatici<sup>50</sup>. È stato anche dimostrato che il caffè attiva una famiglia di enzimi coinvolti nel processo di disintossicazione epatica tra cui uridina-difosfato glucuronosiltransferasi (UGT), con studi iniziali che dimostrano che i diterpeni sono responsabili dell'attivazione di UGT<sup>51,52</sup>. Gressner et al.<sup>53</sup> propone che caffè e caffeina attivino molteplici meccanismi di segnalazione molecolare epatoprotettiva e che una piena comprensione della benefica "miscela" di caffè resti tuttora da determinare. Le molecole del caffè responsabili dei suoi effetti benefici sul fegato sono incerte, anche se diverse sostanze e il metodo di preparazione sono considerati importanti. Il caffè filtrato può fornire il massimo beneficio in quanto è ridotto il contenuto di cafestolo e kahweolo, che possono aumentare il colesterolo nel siero, mantenendo il contenuto di CGA e caffeina. Tuttavia, questi diterpeni oleosi

possono avere proprietà anticancerogene come mostrato in uno studio sulle colture cellulari<sup>54</sup>, probabilmente attraverso processi anti-angiogenetici<sup>55</sup>, che possono spiegare i tassi ridotti di HCC, osservati in una meta-analisi di 6 studi caso-controllo<sup>56</sup>. I polifenoli sono un altro componente del caffè cui possono essere ascritti alcuni dei suoi benefici metabolici. Il principale polifenolo nel caffè è l'acido clorogenico, che ha mostrato una potente attività anti-ossidante sia in vitro su colture cellulari, sia su modelli animali e studi epidemiologici umani<sup>57</sup>. Un recente studio condotto su ratti obesi, alimentati con una dieta ricca di carboidrati e grassi, ha dimostrato che l'estratto di caffè filtrato, ad alta concentrazione di CGA, può attenuare lo sviluppo dell'intolleranza al glucosio e della NAFLD<sup>58</sup>. Questi dati sono convincenti, sebbene non confermino che il CGA sia l'agente benefico specifico e, quindi, la validazione in studi clinici prospettici è obbligatoria. La caffeina può essere responsabile degli effetti benefici del caffè sulla fibrosi epatica. Un ampio studio del National Health and Nutrition Examination Surveys (2001-2008)<sup>59</sup> ha dimostrato, attraverso un'analisi multivariata, che l'assunzione di caffeina era associata a un minor rischio di NAFLD ( $p<0.001$ ), sebbene tale studio osservazionale sia limitato in quanto l'assunzione di caffè e di caffeina sono altamente associati nella maggior parte degli individui<sup>60</sup>. Il meccanismo d'azione con cui la caffeina può avere benefici metabolici o epatici rimane un'area di indagine: i primi dati, che mostrano effetti antiossidanti in vitro, con alte dosi di caffeina<sup>61</sup>, non sono stati replicati in modelli animali o umani e la caffeina non influenza il contenuto dei lipidi. Uno studio condotto su 195 pazienti gravemente obesi sottoposti a valutazione della chirurgia bariatrica ha anche suggerito che la caffeina potrebbe non fornire benefici; i pazienti che consumavano caffè normale

avevano tassi più bassi di fibrosi epatica rispetto a quelli che consumavano caffè espresso<sup>62</sup>. Sulla base dei dati disponibili provenienti da studi prevalentemente osservazionali, sembra esserci un beneficio clinico del consumo di caffè per quei pazienti a rischio di sviluppare fibrosi epatica sia da NAFLD che da epatite virale. Lo sviluppo della sindrome metabolica potrebbe essere migliorata con l'assunzione giornaliera moderata di caffè filtrato. CGA e caffeina sono tra i principali responsabili degli effetti benefici sulla fibrosi epatica, e cafestolo e kahweolo possono ridurre i tassi di HCC. Non è chiaro se alcuni di questi benefici siano abbastanza significativi da "trattare" pazienti con malattia epatica cronica, ma sono necessari ulteriori studi caso-controllo, multicentrici, randomizzati, con dosi standard di ciascuna di queste presunte terapie, e con indagine biochimica ed istologia epatica come end-point. Nel frattempo, l'ingestione moderata giornaliera di caffè non zuccherato è un complemento ragionevole alla terapia, per i pazienti con NAFLD, che include modifiche dello stile di vita con dieta ed esercizio fisico<sup>63</sup>.

### 3. SCOPO DELLA TESI

L'obiettivo del presente studio è stato quello di verificare il possibile coinvolgimento dell'intestino nello sviluppo della NAFLD e di valutare l'efficacia del consumo di caffè nel modulare il metabolismo dei lipidi a livello epatico attraverso l'analisi dell'espressione genica di PPAR $\alpha$ , ACOX1, LXR $\alpha$  e ABCA1 e a livello intestinale di ABCA1, ABCG1, FFAR1. Per verificare la capacità del caffè di influenzare le funzioni di barriera intestinale è stata valutata, inoltre, l'espressione genica delle *tight junctions*. Infine, è stata analizzata la composizione del microbiota intestinale. La fase sperimentale è stata effettuata su topi alimentati con dieta ricca in grassi (HFD) cui è stato somministrato contemporaneamente una dose giornaliera di caffè per 12 settimane (HFD + COFFEE). Le valutazioni condotte a fine esperimento sono state comparate con topi alimentati con HFD ma senza caffè e topi alimentati con dieta standard (SD).

## **4. MATERIALI E METODI**

### **4.1 MODELLO SPERIMENTALE DI STEATOSI EPATICA**

Ai fini dello studio sono stati impiegati 24 topi maschi C57BL/6J del peso di  $20 \pm 0,5$  g, alloggiati in modo casuale in apposite gabbie. Gli animali sono stati forniti da Envigo Italia (Udine, Italia) e sono stati stabulati ad una temperatura ( $22 \pm 1^\circ\text{C}$ ) controllata, ciclo giorno-notte programmato di 12 ore, con libero accesso agli abbeveratoi e al cibo.

I topi, dopo una settimana di acclimatazione, sono stati divisi in tre gruppi ( $n = 8$  ciascuno) e assegnati a una delle seguenti diete per 12 settimane: 1) SD; 2) HFD; 3) HFD con soluzione di caffè decaffeinato (HFD + COFFEE).

La SD è una dieta a basso contenuto glicemico (TD.120455; Envigo Teklad) composta da 186 g di proteine / kg (19% di energia), 506 g di carboidrati / kg (51% di energia), 62 g di grasso / kg (6% di energia), 35 g di cellulosa / kg, con un valore energetico di 3.3 kcal / g.

L'HFD è una dieta iperlipidica (60 % grasso) (TD.06414; Envigo Teklad) composta da 235 g di proteine / kg (18% di energia), 273 g di carboidrati / kg (21% di energia), 343 g di grasso / kg (60% di energia), 65,5 g di cellulosa / kg, con un valore energetico di 5.1 kcal / g.



La bevanda contenente caffè è stata preparata versando acqua bollente su un filtro di carta contenente polvere di caffè decaffeinato (4: 1 v: w) (Illy Caffè, Trieste, Italia). Il caffè filtrato è stato porzionato e conservato a -20°C fino al momento dell'utilizzo. In un esperimento preliminare, abbiamo rilevato che il consumo medio giornaliero di soluzione (acqua o soluzione di caffè) era di circa  $3,5 \pm 0,3$  ml / topo / giorno. La bevanda a base di caffè è stata preparata diluendo 1,5 ml di caffè in 100 ml di acqua.

La dose di caffè somministrato corrispondeva a 6 tazze di caffè espresso o 2 tazze di caffè filtrato per una persona di 70 kg. Il cibo, l'apporto calorico e il peso corporeo sono stati registrati settimanalmente. All'inizio dell'esperimento ( $t_0$  basale) e a 2, 6 e 10 settimane di trattamento, sono stati raccolti campioni di feci, congelati in azoto liquido e conservati a -80°C fino all'estrazione del DNA.

Dopo 12 settimane, gli animali sono stati sacrificati con un eccesso di anestetico. Sono stati conservati campioni di siero per l'analisi dei parametri biochimici di danno metabolico ed epatico. Il duodeno, il colon e il cieco con tutto il contenuto sono stati raccolti e conservati a -80°C fino alle successive analisi. Il fegato di ciascun topo è stato prelevato, pesato in toto, sottoposto a valutazione macroscopica e sezionato in più aliquote congelate a -80°C. Una porzione di tessuto epatico è stata fissata in formaldeide al 4% e inclusa in paraffina.

Il protocollo sperimentale è stato approvato dal Comitato Etico per gli esperimenti sugli animali presso l'Università Federico II di Napoli secondo le linee guida istituzionali. Tutti gli animali hanno ricevuto cure secondo i criteri delineati nella

National Institutes of Health Guide per la cura e l'uso degli animali da laboratorio (National Institutes of Health, Eighth Edition 2011).

#### **4.2 DETERMINAZIONE DEI PARAMETRI EMATOCHIMICI DI DANNO METABOLICO ED EPATICO**

I livelli sierici di alanina aminotransferasi (ALT), colesterolo totale e trigliceridi sono stati misurati utilizzando i saggi automatizzati di routine (sistema Reflotron Plus di Roche Diagnostic, Milano, Italia). Il contenuto dei trigliceridi nel fegato è stato misurato in estratti lipidici di tessuto epatico, precedentemente congelato, utilizzando un kit di quantificazione dei trigliceridi (BioVision, Mountain View, Calif) secondo il protocollo del produttore. I dati ottenuti sono stati normalizzati dalla concentrazione proteica del tessuto misurata col metodo Bradford (Bio-Rad).

#### **4.3 ANALISI ISTOLOGICA E VALUTAZIONE DEL GRADO DI STEATOSI EPATICA**

Il campione di tessuto epatico fissato in formalina al 4% ed incluso in paraffina è stato sezionato. Le sezioni di 5 µm di spessore sono state montate su vetrino e, dopo essere state deparaffinate e reidratate, sono state colorate con tecnica standard Ematossilina-Eosina (H&E).

L' H&E è la colorazione di base per lo studio istologico. L'ematossilina di per sé è incapace di colorare, ma il suo prodotto di ossidazione, l'emateina, rappresenta il cromoforo ed essendo una molecola basica ha affinità con le sostanze acide,

permette, di colorare in blu violetto i nuclei, membrane cellulari ed elastina. L'eosina, invece, è un colorante di contrasto, acido e tinge in rosso rosato il citoplasma, il tessuto connettivo e le fibre collagene.

Tutte le valutazioni istologiche sono state effettuate in cieco da un esperto anatomicopatologo. L'analisi istologica sui campioni di fegato è stata effettuata per valutare il grado di steatosi. La steatosi macrovescicolare è stata valutata a basso ingrandimento (4x) come percentuale di epatociti positivi e valutata di grado 0 con range tra 0 e <5%, di grado 1 con range tra 6 e 33%, di grado 2 con range tra 34 e 66% e di grado 3 se >66%. La steatosi microvescicolare è stata valutata ad un ingrandimento maggiore (20x) e riportata come percentuale di cellule affette. Foci lobulari necroinfiammatori sono stati ricercati e valutati come presenti o assenti.

#### **4.4 ESTRAZIONE DI RNA E REAL TIME PCR IN CAMPIONI DI TESSUTO EPATICO E INTESTINALE**

L'estrazione dell'RNA totale dai campioni di fegato, duodeno e colon è stata effettuata mediante il kit commerciale RNeasy Plus Mini Handbook (*Qiagen, Hilden, Germania*). Questo metodo di estrazione prevede l'uso di membrane di silice in formato *spin column* alle quali l'RNA si lega in modo specifico ed in seguito a successivi lavaggi con specifici buffer e centrifugazioni, viene purificato da qualsiasi contaminante, ed infine eluito in acqua RNasi free.

La resa dell' RNA totale, così ottenuto, è stata quantificata utilizzando lo spettrofotometro *NanoDrop ND-100*.

Con la doppia lettura effettuata a 260 e a 280 nm è stata valutata la purezza dell'RNA valutando per buono il rapporto spettrofotometrico  $A_{260}/A_{280} \geq 1.8$ , dove  $A_{260}$  è l'assorbanza relativa agli acidi nucleici, mentre  $A_{280}$  è indice della contaminazione proteica. Dopo questo passaggio l'RNA è stato conservato a  $-80^{\circ}\text{C}$ , fino al successivo utilizzo.

In seguito al controllo e alla quantizzazione dell'RNA si procede con una reazione di RT/PCR. La reazione di retrotrascrizione prevede la sintesi di DNA copia a partire da stampi di RNA. Due microgrammi di RNA totale sono stati utilizzati nella sintesi del primo filamento di cDNA mediante kit *Taq-Man Reverse Transcription Reagents* (Applied Biosystems<sup>®</sup>, Branchburg, NJ, USA). La trascrittasi inversa, presente nella miscela di reazione, è una DNA polimerasi che utilizza RNA a singolo filamento come stampo e, in presenza di un *primer*, sintetizza un filamento complementare di DNA. Il cDNA è stato diluito con acqua RNase-free per un volume finale di 200  $\mu\text{l}$  e conservato a  $-20^{\circ}\text{C}$ .

La Real Time PCR, denominata anche PCR quantitativa o PCR quantitativa in tempo reale, è un metodo di amplificazione e quantificazione simultanea del DNA.

Con questa metodica è stata valutata l'espressione genica nei vari tessuti

- ✓ in campioni di fegato: di PPAR $\alpha$ , di ACOX1 (Acyl-CoA Oxidase 1), di ABCA1 (ATP-Binding Cassette Transporter A1), di LXR- $\alpha$  (Liver X Receptor Alpha);
- ✓ in campioni di duodeno: di PYY (Peptide YY), di FFAR1 (Free Fatty Acid Receptor 1), di FFAR3 (Free Fatty Acid Receptor 3), di claudina, di

occludina, di ZO-1 (Zonula occludens-1), di ABCA1, di ABCG1 (ATP-Binding Cassette Transporter G1);

✓ in campioni di colon: di FFAR1, di FFAR3, di ZO-1.

Il calcolo della quantità di DNA dei campioni incogniti viene effettuata determinando il ciclo della PCR (Cycle Threshold, Ct) in cui viene raggiunto il valore soglia di fluorescenza del reporter e dove cioè i segnali di amplificazione specifici sono separabili da quelli del rumore di fondo del sistema. Il numero dei cicli necessari perché un campione raggiunga il suo Ct è inversamente proporzionale al numero di copie target presenti inizialmente. Il vantaggio in termini di precisione e di intervallo di quantificazione rispetto alle PCR tradizionali, è dovuto alla possibilità di quantificare il DNA al ciclo soglia, che è sempre calcolato nella fase esponenziale della reazione PCR, fase in cui i reagenti sono ancora lontani dall'esaurimento e gli elementi di variabilità sono così ridotti al minimo.

La metodica “*Taq-Man*” utilizza delle sonde caratterizzate dal fatto di essere un oligonucleotide dotato sia di un fluorocromo “reporter” (un fluorocromo ad alta energia che emette fluorescenza) che di un “quencher” (fluorocromo a bassa energia che spegne la fluorescenza del reporter).

Quando la sonda è intatta, la fluorescenza del reporter è spenta dalla vicinanza del quencher perché i fotoni di R vengono assorbiti da Q; ma quando la sonda è rotta dalla *Taq* polimerasi, l'attività dei fluorocromi viene rilevata.

Se è avvenuta l'ibridazione, l'attività 5' esonucleasica della *Taq* polimerasi rompe la sonda interna durante la fase di estensione, emettendo un segnale di fluorescenza.

L'aumento di fluorescenza del Reporter è direttamente proporzionale al numero di

ampliconi generati. I livelli di espressione genica di PPAR- $\alpha$  ACOX1, PYY, FFAR1, FFAR3, claudina, occludina, ZO-1, ABCA1, ABCG1 e LXR- $\alpha$  sono stati analizzati utilizzando *Taq-Man\_Gene Expression Assays* (Applied Biosystems<sup>®</sup>) (Tabella 2). La RT-PCR quantitativa è stata effettuata in triplicato usando una miscela di primer / sonda pre-ottimizzata e master mix PCR universale TaqMan (Applied Biosystems<sup>®</sup>) su un sistema RT-PCR StepOne TM in un formato a 48 pozzetti (Applied Biosystems<sup>®</sup>). Il gene housekeeping GAPDH è stato utilizzato come controllo endogeno per la normalizzazione dei test di espressione genica. I dati relativi all'espressione genica sono stati valutati utilizzando il metodo delta-delta Ct.

**Tabella 2:** Controllo endogeno e sonde utilizzate.

Gene	ASSAY ID
Mouse Gapdh	Mn03302249 _g1
MouseTjp1	Mn00493699 _m1
Cldn1	Mm00516701 _m1
Ocln	Mm00500912 _m1
Ffar1	Mm00809442 _s1
Ffar3	Mm02621638 _s1
Pyy	Mm00520716 _g1
ACOX1	Mm01246831 _m
Ppar alpha	Mn00440939 _m1
Abca1	Mm00442646 _m1
Abcg1	Mm00437390 _m1

#### **4.5 COMPOSIZIONE DEL MICROBIOTA INTESTINALE**

Campioni fecali (circa 0,3 g) sono stati utilizzati per l'estrazione del DNA con il kit di isolamento del DNA PowerSoil (Mo Bio Laboratories, Inc., Carlsbad, CA). La regione V1-V3 del gene rRNA 16S (circa 520 bp) è stata amplificata e le librerie PCR sono state preparate e sequenziate come precedentemente riportato<sup>66</sup>.

#### **4.6 COMPOSIZIONE LIPIDICA DEL CONTENUTO CECALE**

La caratterizzazione lipidica del contenuto del cieco nel nostro modello di studio è stata effettuata per verificare se nei topi a dieta grassa che assumono caffè si verifichi una variazione della digestione dei lipidi e/o una alterazione della loro composizione indotta da un miglioramento del sistema intestinale coinvolto nel metabolismo dei grassi.

L'estrazione di lipidi dai campioni di cieco è stata eseguita secondo il protocollo di Gregory et al.<sup>64</sup> modificato. Gli estratti sono stati analizzati mediante spettrometria di massa ad alta risoluzione LC (HRMS) adattando il metodo descritto da Bird et al.<sup>65</sup>. Per l'estrazione lipidica, il materiale cecale è stato diluito 1:10 in acqua, il campione è stato agitato su Vortex per 1 minuto e sono stati estratti 50 µL di sospensione fecale utilizzando 1 mL di cloroformio: metanolo (2: 1, v / v). I campioni sono stati agitati su vortex per 20 secondi e centrifugati a 14800 rpm, 10°C, per 5 minuti. Questa operazione è stata ripetuta due volte, i surnatanti sono stati uniti e a 2 mL di acqua sono stati aggiunti 0,07 M di KCl per indurre la

separazione di fase. La fase organica è stata essiccata sotto una corrente di azoto e risospesa in 500  $\mu$ L di acetonitrile / isopropanolo / acqua (65: 30: 5, v / v / v), ultracentrifugata a 14800 rpm per 3 minuti e analizzata mediante HRMS. I dati sono stati acquisiti su un sistema Accela U-HPLC accoppiato a uno spettrometro di massa Exactive Orbitrap (*Thermo Fisher Scientific, San Jose, CA*) dotato di un'interfaccia electrospray riscaldata (HESI). È stata utilizzata una colonna Kinetex 2.6  $\mu$  C18 100 A (100 mm  $\times$  2.1 mm) (*Phenomenex, Torrance, CA*) termostata a 45°C. Le fasi mobili consistevano in 40:60 acqua / acetonitrile 5 mM di formiato di ammonio e 0,1% di acido formico (A) e 90:10 di isopropanolo / acetonitrile 5 mM di formiato di ammonio e 0,1% di acido formico (B). È stata applicata un'eluizione con gradiente secondo il protocollo di Gregory et al.<sup>64</sup>. La portata è stata impostata a 200  $\mu$ L/min e il volume di iniezione era 10  $\mu$ L. L'acquisizione è stata eseguita in modalità di ionizzazione sia positiva che negativa, nell'intervallo di massa di m / z 120-1200. Il potere di risoluzione è stato impostato su 50.000 a larghezza intera a metà massimo (FWHM, m / z 200) con un tempo di scansione di 1 s. Il controllo automatico del guadagno è stato utilizzato in modalità bilanciata ( $1 \times 10^6$  ioni); il tempo massimo di iniezione era di 100 ms. I parametri dell'interfaccia erano i seguenti: la tensione di spruzzatura era a 3,5 kV (modo positivo) e 3,0 kV (modo negativo), tensione capillare 30V, temperatura del riscaldatore a 350°C, temperatura capillare a 250°C, gas guaina a 35 unità arbitrarie, e gas ausiliario a 15 unità arbitrarie. L'acquisizione dei dati cromatografici e l'integrazione dei picchi sono stati eseguiti utilizzando il software Xcalibur (*Thermo Fisher Scientific, San Jose, USA*).



L'identificazione degli acidi grassi liberi è stata ottenuta utilizzando il software ExactFinder 2.0 (*Thermo Fisher Scientific, Brema, Germania*) mediante l'applicazione di un appropriato database. Formule molecolari specifiche e rispettivi rapporti  $m/z$  sono stati inclusi in ExactFinder e sono stati selezionati i seguenti parametri: massa esatta dello ione mono-isotopico (accuratezza della tolleranza di massa sperimentale inferiore a 5 ppm), pattern isotopico, tempo di ritenzione, rapporto segnale / rumore superiore a 5.

I trigliceridi sono stati rilevati in modo positivo in modo predominante  $[M + NH_4]^+$  ioni e sono stati integrati nella regione cromatografica tra i tempi di ritenzione di 22-24,5 minuti. Gli acidi grassi liberi sono stati rilevati in modo negativo come  $[M - H]^-$  ioni nella regione cromatografica tra 3-7,5 min.

#### **4.7 ANALISI STATISTICA**

L'analisi statistica è stata effettuata mediante l'utilizzo del software GraphPad Prism 5 (GraphPad Software, CA, USA). I risultati sono stati espressi come media  $\pm$  l'errore standard (SEM). Le differenze tra i gruppi sono state analizzate mediante analisi della varianza (ANOVA) seguita dal test di comparazione multiplo di Tukey. Differenze tra gruppi con  $p < 0.05$  sono state considerate statisticamente significative.

Per la composizione del microbiota fecale sono state condotte analisi statistiche in ambiente R (<https://www.r-project.org>). DeSeq2<sup>69</sup> ha determinato l'abbondanza differenziale di taxa specifici secondo la dieta o l'assunzione di caffè. Principal

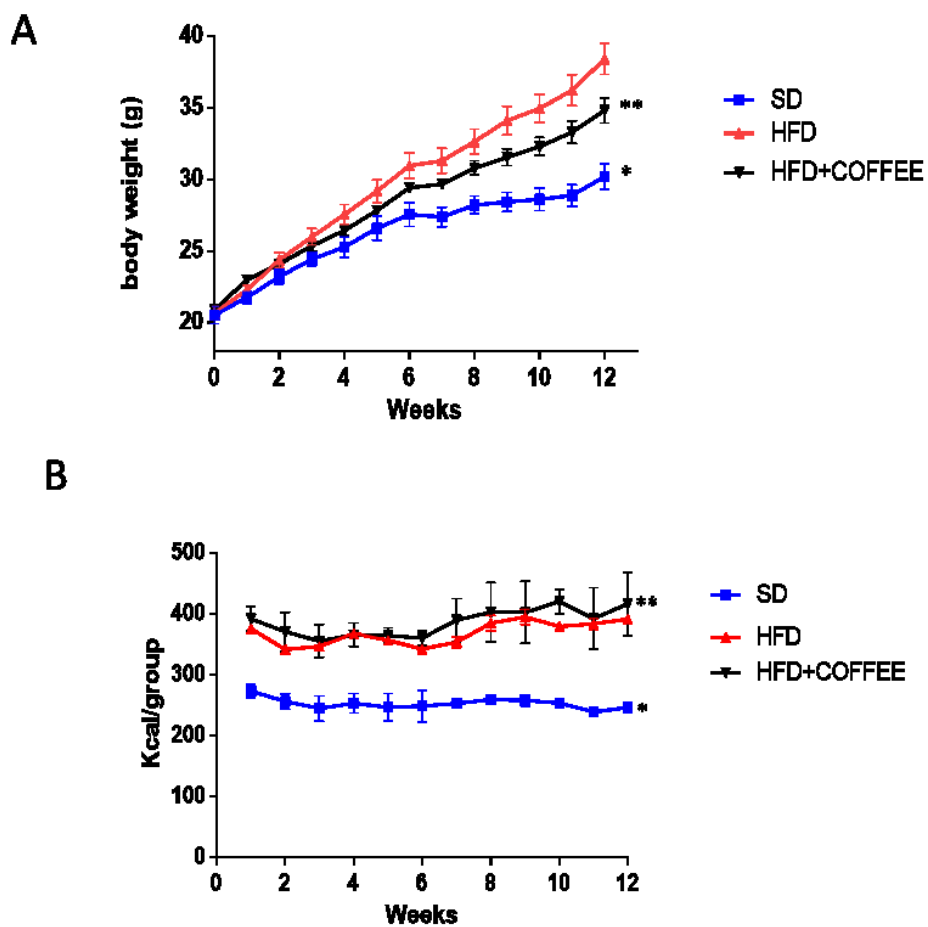
Components Analysis (PCA) è stata effettuata sull'abbondanza normalizzata ( $\text{Log}_{10}$ ) del microbiota a livello di genere (funzione `dudi.pca` nel pacchetto R `made4`).

## 5. RISULTATI

### 5.1 ADERENZA ALLA DIETA NEL MODELLO SPERIMENTALE

Dopo 12 settimane di trattamento, i topi alimentati con HFD (con o senza caffè) mostrano un aumento di peso significativo rispetto ai topi alimentati con SD ( $p < 0.001$  per entrambi i gruppi) (Figura 1A). A partire dall'ottava settimana di trattamento, i topi alimentati con HFD e HFD + COFFEE hanno avuto un diverso andamento di crescita. Nello specifico, i topi HFD + COFFEE hanno progressivamente ridotto l'incremento del peso corporeo rispetto ai topi HFD ( $p < 0.05$ ). Questa differenza è stata mantenuta fino alla 12<sup>°</sup> settimana, quando i topi HFD + COFFEE pesavano  $34,8 \pm 2,5$  g e i topi HFD pesavano  $38,4 \pm 3,0$  g ( $p < 0,01$ ).

La figura 1B mostra l'andamento dell'*intake* calorico settimanale per i differenti gruppi di trattamento. È possibile evidenziare che i topi alimentati con HFD, con o senza caffè, mostrano un introito calorico significativamente maggiore rispetto ai topi alimentati con SD ( $386,2 \pm 7,1$  kcal e  $369,2 \pm 5,8$  kcal vs  $253,0 \pm 2,6$  kcal,  $p < 0,001$  per entrambi i confronti). Inoltre, i topi alimentati con HFD + COFFEE hanno un consumo di cibo più elevato rispetto a quelli HFD ( $386,2 \pm 7,1$  kcal vs  $369,2 \pm 5,8$  kcal,  $p < 0,05$ ) (Figura 1B).



**Figura 1. Andamento del peso (A) e intake calorico settimanale medio (B) per gruppo di trattamento. In A)  $*p < 0.001$  vs HFD e HFD + COFFEE,  $**p < 0.001$  vs HFD; in B)  $*p < 0.0001$  vs HFD and HFD + COFFEE,  $**p < 0.05$  vs HFD.**

## 5.2 VALUTAZIONE DEI PARAMETRI METABOLICI

Al termine del trattamento di 12 settimane sono stati valutati i livelli sierici di colesterolo totale, trigliceridi, ALT e glicemia (Tabella 3). I dati hanno mostrato che entrambi i gruppi di topi alimentati con HFD avevano concentrazioni di colesterolo circolante più elevate rispetto ai topi alimentati con SD ( $238.50 \pm 42.30$  vs  $106.83 \pm 11.32$ ,  $p < 0.001$  per HFD e  $160.63 \pm 23.79$  vs  $106.83 \pm 11.32$ ,  $p < 0.001$  per HFD + CAFFÈ vs SD). Tuttavia, più basse concentrazioni di colesterolo sono state registrate in HFD + COFFEE rispetto a HFD ( $160.63 \pm 23.79$  vs  $238.50 \pm 42.30$ ,  $p < 0.001$ ). Analogamente, l'assunzione di caffè riduce i livelli di ALT sierica nei topi alimentati con HFD ( $p < 0.05$ ). È interessante notare una significativa riduzione della glicemia nei topi HFD + COFFEE vs SD ( $p < 0.05$ ). Tra i vari gruppi non si riscontrano differenze statisticamente significative nei livelli sierici di trigliceridi.

**Tabella 3. Livelli sierici di colesterolo totale, trigliceridi, ALT e glucosio.**

	<b>SD</b>	<b>HFD</b>	<b>HFD +COFFEE</b>
<b>Colesterolo totale (mg/dL)</b>	$106.83 \pm 11.32$	$238.50 \pm 42.30^*$	$160.63 \pm 23.79^{* \#}$
<b>Trigliceridi (mg/dL)</b>	$103.67 \pm 22.17$	$110.38 \pm 34.72$	$110.63 \pm 20.39$
<b>ALT (U/L)</b>	$53.33 \pm 39.82$	$56.88 \pm 16.07$	$45.86 \pm 36.20^{##}$
<b>Glucosio (mg/dL)</b>	$271.9 \pm 4.92$	$275.5 \pm 6.07$	$82.0 \pm 7.07^{* \#}$

\*  $p < 0.001$  vs SD;  $^{\#} p < 0.001$  vs HFD;  $^{##} p < 0.05$  vs HFD

### 5.3 ANALISI ISTOLOGICA E VALUTAZIONE DEL GRADO DI STEATOSI EPATICA

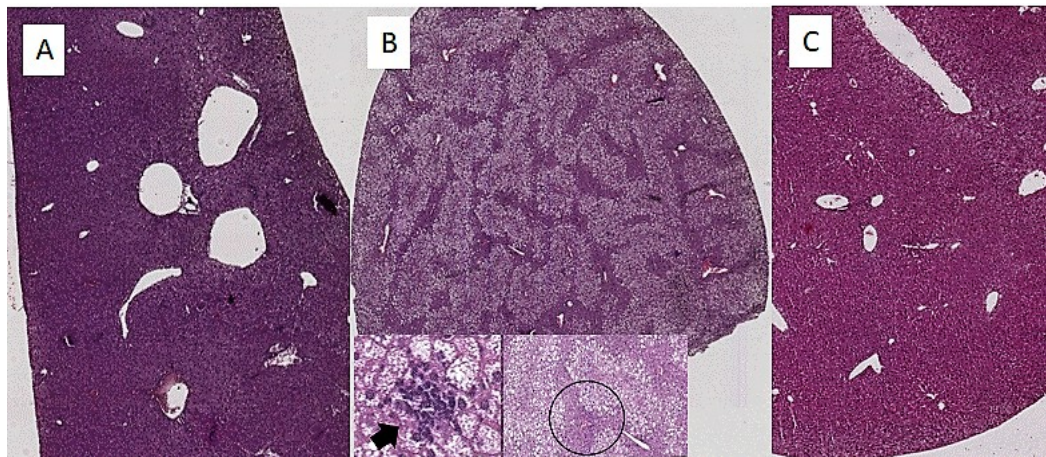
Al momento del sacrificio il fegato di ciascun topo è stato prelevato e pesato. Per eliminare un eventuale *bias* derivante da differenze intra-gruppo, il peso del fegato è stato normalizzato rispetto al peso corporeo, ed è stato calcolato il “liver-body weight ratio”. I dati hanno mostrato un ridotto rapporto nei topi HFD + COFFEE rispetto a quelli HFD ( $3,06 \pm 0,06$  vs  $3,47 \pm 0,15$ ,  $p < 0,05$ ) e SD ( $3,06 \pm 0,06$  vs  $3,59 \pm 0,06$ ,  $p < 0,01$ ).

I preparati istologici dei fegati dei topi alimentati con dieta standard non mostrano alterazioni epatocitarie. La vena centro lobulare appare circondata dagli epatociti, disposti radialmente in colonne ordinate ed il nucleo, colorato in blu, è situato al centro della cellula. Del tutto assenti, od occasionali, sono gli accumuli lipidici (Fig. 2 A).

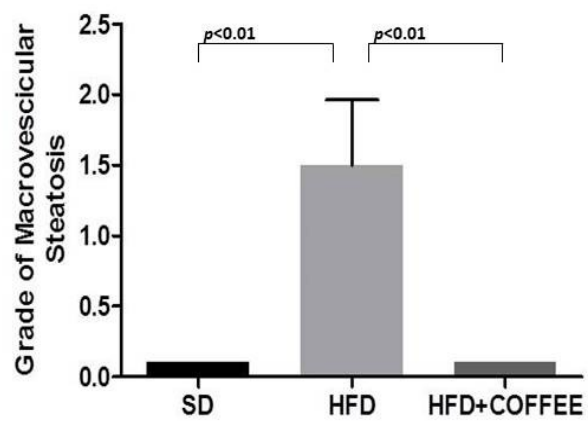
I fegati dei topi alimentati con HFD mostrano alterazione della struttura della cellula epatica, con il nucleo disposto lateralmente alla parete cellulare (ballooning) con una marcata presenza di gocce lipidiche intraepatocitarie che coinvolge circa il 90% degli epatociti. La steatosi osservata in questo gruppo è di tipo micro e macrovacuolare (Fig. 2 B).

Nei preparati istologici dei topi trattati con HFD e supplementati con caffè, la presenza di gocce lipidiche intraepatocitarie è nettamente ridotta e la struttura cellulare è confrontabile con quella dei topi SD (Fig. 2 C).

La steatosi macrovescicolare è stata valutata 0 in tutti i fegati dei topi SD e HFD + COFFEE, mentre nel gruppo HFD solo 3 casi avevano punteggio 0 ( $p<0,01$ ) (Figura 2.1). La steatosi microvescicolare era meno grave nei topi HFD + COFFEE, anche se la differenza con il gruppo HFD non era statisticamente significativa. Foci lobulari necro-infiammatori sono stati osservati in 4 dei topi HFD e nessuno del gruppo HFD + COFFEE ( $p<0,01$ ).



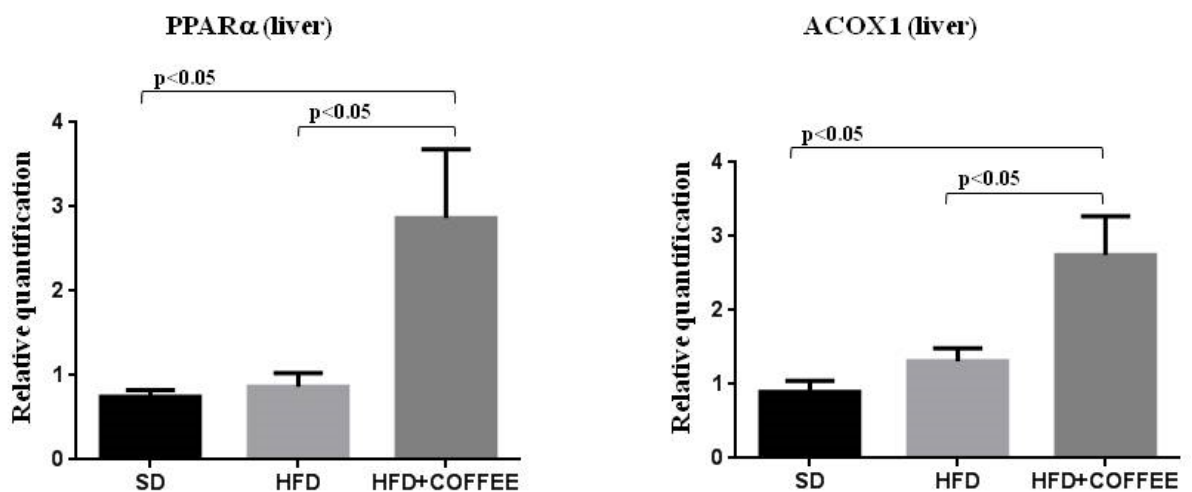
**Fig. 2: Analisi istologica con colorazione H&E dei campioni di fegato dei gruppi di trattamento.** A: fegato di topi alimentati con SD che mostra completa assenza di steatosi; B: grave steatosi nei topi alimentati con dieta HFD, risparmiando solo un piccolo bordo di epatociti peri-portale (cerchio nero); in questo fegato sono stati osservati foci lobulari necro-infiammatori (freccia); C: assenza di steatosi nei topi alimentati con HFD + COFFEE.



**Fig. 2.1: Classificazione della steatosi macrovesicolare nel fegato dei topi SD, HFD e HFD + COFFEE.** La differenza tra i tre gruppi era statisticamente significativa ( $p < 0,01$ ).

## 5.4 FATTORI EPATICI ALLA BASE DELLA DEPOSIZIONE DEL GRASSO

La figura 3 mostra l'espressione genica di PPAR- $\alpha$  e ACOX1 a livello epatico nei tre gruppi di trattamento. I dati hanno mostrato una duplice up-regolazione di PPAR- $\alpha$  e ACOX1, nel fegato dei topi HFD + COFFEE rispetto a SD ( $p < 0,05$ ) e ai topi HFD ( $p < 0,05$ ). Ciò conferma che il caffè è in grado di promuovere la  $\beta$ -ossidazione nel fegato.



**Fig. 3: Modulatori della  $\beta$ -ossidazione dei grassi nel fegato.** Espressione genica di PPAR- $\alpha$  e ACOX1 nei tre gruppi di trattamento SD, HFD e HFD + COFFEE.

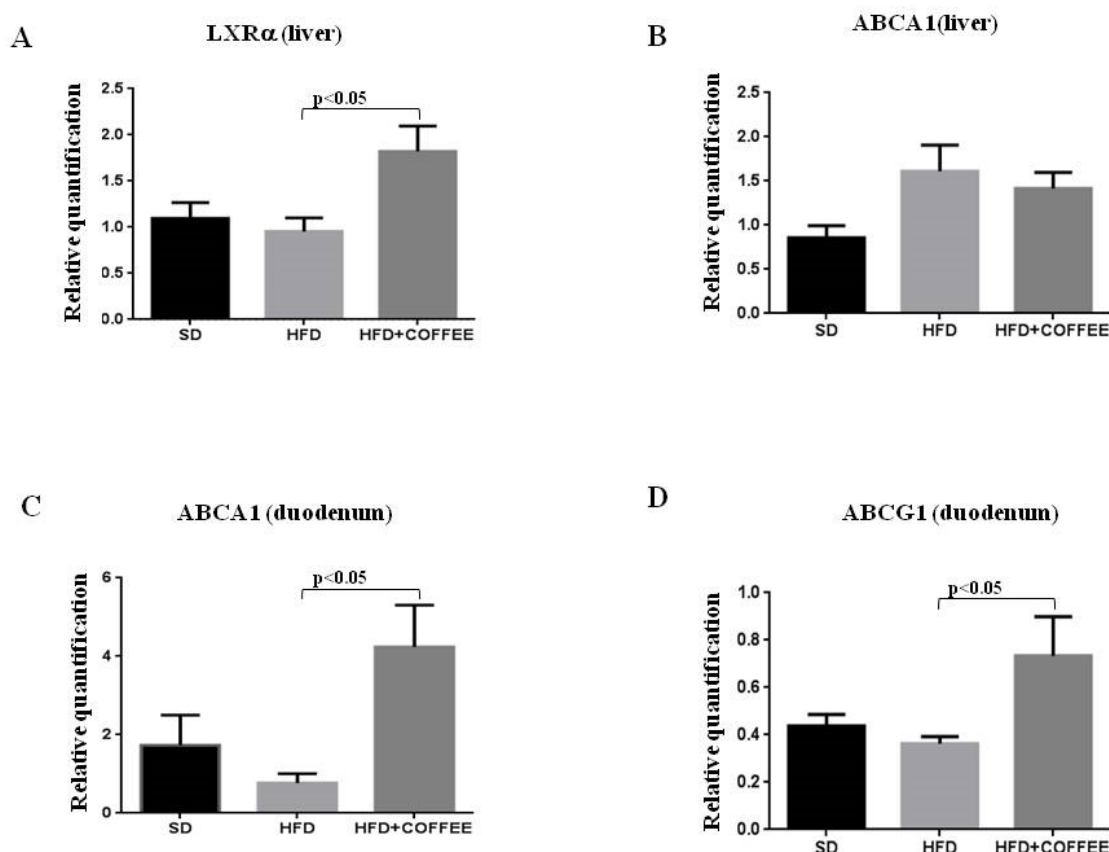
*Il PPAR $\alpha$  è un fattore di trascrizione che appartiene, insieme a PPAR $\gamma$  e PPAR $\beta$  /  $\delta$ , alla sottofamiglia del recettore nucleare NR1C. Molti geni bersaglio di PPAR $\alpha$  sono coinvolti nel*



*metabolismo degli acidi grassi nei tessuti con alti tassi di ossidazione come muscolo, cuore e fegato. L'attivazione di PPAR $\alpha$ , in combinazione con l'agonismo PPAR $\beta$  /  $\delta$ , migliora la steatosi, l'infiammazione e la fibrosi in modelli pre-clinici di steatosi epatica non alcolica, identificando una nuova potenziale area terapeutica. I ligandi di PPAR $\alpha$  sono derivati di acidi grassi formati durante la lipolisi, la lipogenesi o il catabolismo degli acidi grassi. L'enzima che caratterizza il primo step limitante della  $\beta$ -ossidazione, ACOX1, è probabilmente tra gli agonisti di PPAR $\alpha$ . Coerentemente, la dislocazione di ACOX1 nei topi determina un aumento della proliferazione perossisomiale ed una elevata espressione del gene target PPAR $\alpha$ <sup>70</sup>.*

## **5.5 FATTORI EPATICI E INTESTINALI ALLA BASE DELL'EFFLUSSO DI COLESTEROLO**

La figura 4 mostra l'effetto dei diversi trattamenti alimentari sull'espressione genica a livello epatico di LXR- $\alpha$  (A) e ABCA1 (B) nonché di ABCA1 (C) e ABCG1 (D) a livello duodenale. L'espressione del gene LXR- $\alpha$  nel fegato aumenta col consumo di caffè e si registra una tendenza all'aumento di espressione di ABCA1 nei topi a dieta grassa (HFD) rispetto a SD ( $p=0,07$ ). A livello intestinale, i dati mostrano una up-regolazione dell'espressione genica di ABCA1 e ABCG1 nei topi alimentati con HFD + COFFEE vs HFD ( $p<0,05$ ) e una tendenza vs SD ( $p=0,0882$  e  $p=0,0895$ ). In sintesi, l'assunzione di caffè stimola l'efflusso di colesterolo.



**Fig. 4: Modulatore di efflusso di colesterolo a livello epatico ed intestinale.**  
Espressione genica di LXRα (A) e ABCA1 (B) nel fegato e di ABCA1 (C) e ABCG1 (D) nel duodeno.

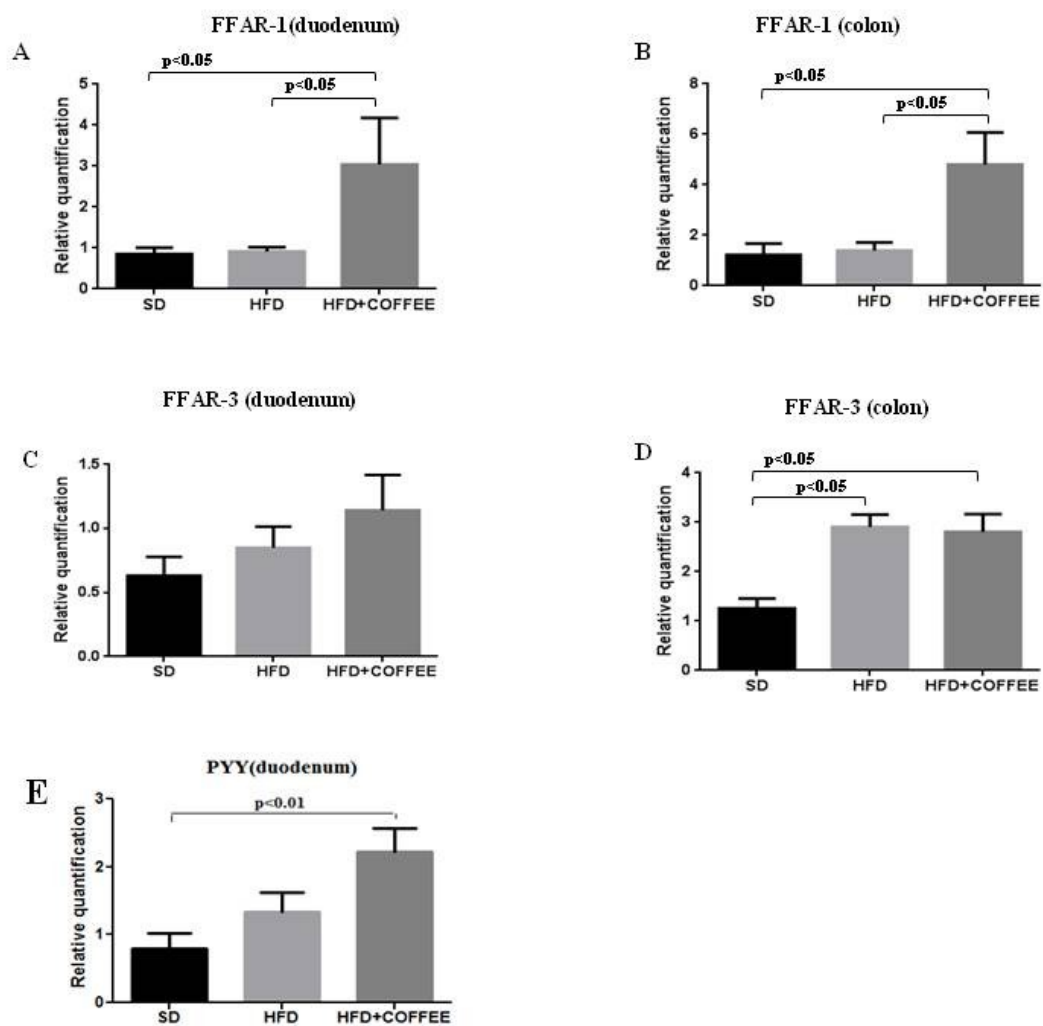
È noto da tempo che i due fattori trascrizionali LXRα ed LXRβ (Liver X Receptor α e Liver X Receptor β (indicati collettivamente come LXR) partecipano al controllo della omeostasi del colesterolo attivandosi quando il contenuto intracellulare di colesterolo libero aumenta. In questa condizione si formano nella cellula derivati ossidati del colesterolo (genericamente indicati come ossisteroli) che si legano selettivamente a LXR. Il legame degli ossisteroli (particolarmente il 24(S), 25-epoxicolessterolo e 22 (R)-idrossicolessterolo) attiva LXR che a sua volta induce l'espressione di alcuni geni che mediano l'efflusso di colesterolo dalla membrana plasmatica ad accettori extracellulari. Fra questi, di particolare importanza, sono i geni che codificano per due trasportatori di membrana: ABCA1 e ABCG1<sup>71,72</sup>. Quindi in condizioni di eccesso di colesterolo nella cellula si realizzano due eventi finalizzati a contrastare il sovraccarico di colesterolo: 1) la mancata

*attivazione di SREBP-2 (Sterol Regulatory Element Binding Protein -2), con conseguente obliterazione della produzione dei LDL-R (recettore delle LDL) e blocco della sintesi endogena di colesterolo; 2) l'attivazione di LXR con conseguente aumentata eliminazione di colesterolo dalla cellula.*

## **5.6 FATTORI INTESTINALI IMPLICATI NEL SENSING DEI LIPIDI E NEL METABOLISMO ENERGETICO**

La figura 5 mostra l'effetto dei trattamenti dietetici sull'espressione genica di FFAR-1 (A e B) e FFAR-3 (C e D) nel duodeno e nel colon. I dati mostrano che il consumo di caffè (HFD + COFFEE) induce una up-regolazione di FFAR-1 in entrambi i distretti, in particolare nel duodeno ( $p < 0,05$  vs HFD e vs SD) e nel colon ( $p < 0,05$  vs HFD e vs SD) mentre FFAR-3 nel colon è up-regolato nei topi alimentati con HFD indipendentemente dall'assunzione di caffè ( $p < 0,05$  per HFD vs SD e  $p < 0,05$  per HFD + COFFEE vs SD).

I nostri risultati mostrano che PYY è up-regolato nel duodeno dei topi HFD + COFFEE vs topi SD ( $p < 0,01$ ), mentre non sono state registrate differenze significative tra i topi HFD + COFFEE vs HFD o topi HFD vs SD (Fig. 5E).



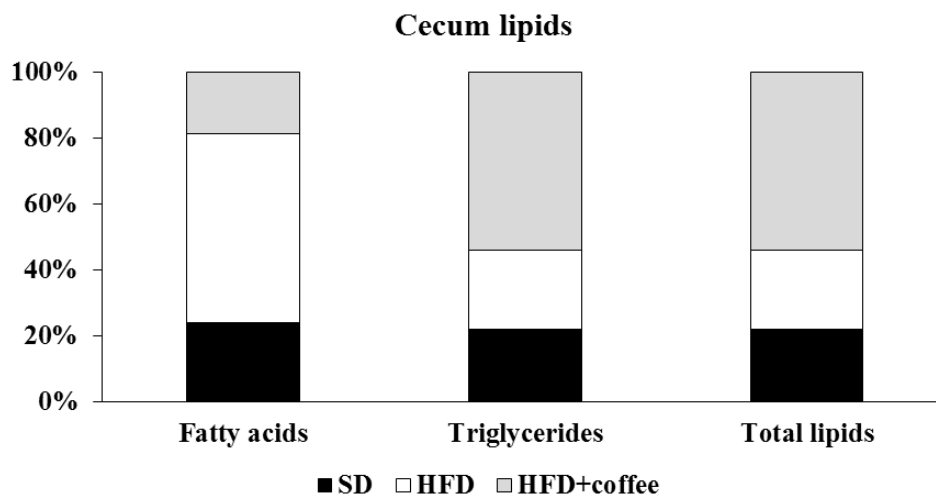
**Fig. 5: Modulatore del metabolismo intestinale dei lipidi e del metabolismo energetico.** Espressione genica di FFAR1 (A e B) e FFAR3 (C e D) nel duodeno e nel colon, e PYY (E) nel duodeno dei topi alimentati con SD, HFD e HFD + COFFEE.

Un recettore specifico per gli acidi grassi liberi (SCFA), chiamato FFA1 (Free Fatty Acid 1), meglio conosciuto come GPR40 (G-protein coupled receptor 40), è codificato nell'uomo dal gene FFAR-1. Questa proteina di membrana lega gli acidi grassi liberi, agendo come un sensore dei nutrienti per la regolazione dell'omeostasi energetica. E' molto espresso a livello delle isole pancreatiche dove modula la secrezione insulinica. Il secondo recettore degli SCFA è il GPR41, chiamato anche

*FFAR3; questo è in grado di indurre la secrezione enteroendocrina dell'ormone peptidico YY e del GLP-1 (Glucagon-like peptide 1) e, in questo modo, può migliorare la sensibilità insulinica in seguito a stimolazione da parte degli SCFA prodotti dal microbiota intestinale<sup>73</sup>.*

*Molti peptidi prodotti dall'intestino influenzano in modo diverso il comportamento alimentare agendo a livello del SNC e i più conosciuti tra questi sono Colecistochinina (CCK), GLP-1 e PYY, molecole che hanno la proprietà comune di regolare il comportamento alimentare a multipli livelli. Il PYY è un ormone appartenente alla famiglia dei Neuropeptidi Y insieme al Polipeptide Pancreatico (PP), anche esso coinvolto nella regolazione del comportamento alimentare e con il quale presenta grande omologia di struttura e funzione. Il Peptide YY è prodotto nelle cellule L della mucosa intestinale dell'ileo e del colon (intestino distale), ed è espresso dal sistema cellulare a differenti livelli dell'asse cerebro-intestinale. Il Livello di PYY aumenta con l'assunzione di cibo e raggiunge i livelli massimi dopo 1 o 2 ore, rimanendo elevato per lungo tempo. Questo suggerisce come il suo ruolo principale sia quello di "fattore di sazietà" piuttosto che quello di "terminatore alimentare"<sup>74</sup>.*

È interessante notare che nel cieco è presente una maggiore quantità di lipidi, principalmente sotto forma di trigliceridi, nei campioni prelevati dai topi HFD + COFFEE rispetto agli altri. In particolare, gli acidi grassi liberi erano il 2,4% dei lipidi totali nei topi HFD + COFFEE, il 16% nei topi HFD e il 7,4% nei topi SD (Figura 6).



**Fig. 6: Composizione lipidica del contenuto cecale nei tre gruppi di trattamento SD, HFD e HFD + COFFEE.**

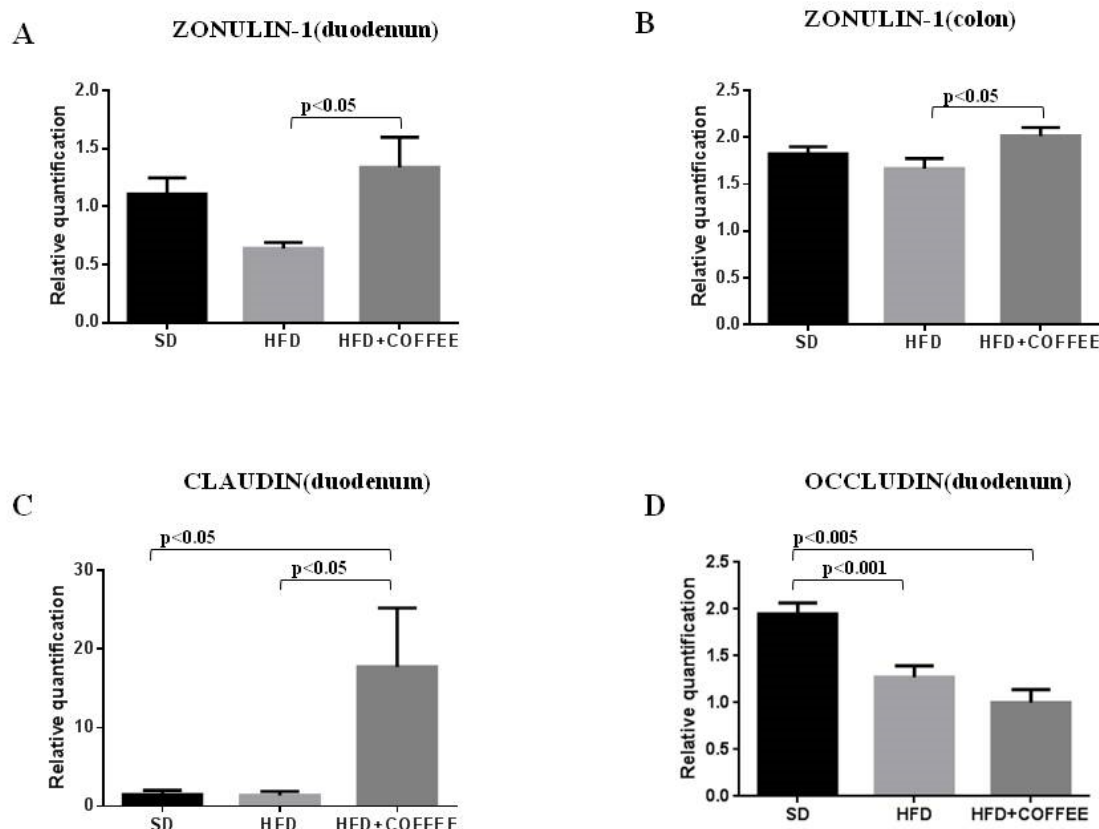
I dati mostrano una maggiore quantità di lipidi totali, principalmente sotto forma di trigliceridi, nei campioni prelevati dai topi alimentati con HFD + COFFEE rispetto agli altri due gruppi.

## 5.7 PERMEABILITÀ INTESTINALE E MICROBIOTA

Per stabilire se il consumo di caffè è in grado di modulare la permeabilità intestinale, è stata valutata l'espressione di ZO-1, occludina e claudina sui diversi campioni intestinali (Figura 7).

Abbiamo evidenziato una significativa up-regolazione di ZO-1 sia a livello duodenale che nel colon dei topi alimentati con HFD + COFFEE *vs* HFD ( $p < 0,05$ ), e una up-regolazione di claudina nel duodeno dei topi alimentati con HFD + COFFEE sia *vs* HFD ( $p < 0,05$ ) che *vs* SD ( $p < 0,05$ ).

Viceversa, occludina è down-regolata da HFD e HFD + COFFEE *vs* SD ( $p < 0,0001$  e  $p < 0,005$ , rispettivamente).



**Fig. 7: Modulatori della permeabilità intestinale.** Espressione genica della proteina Zonulin-1 nel duodeno (A) e nel colon (B), e di Claudina (C) e Occludina (D) nel duodeno dei topi SD, HFD e HFD + COFFEE.

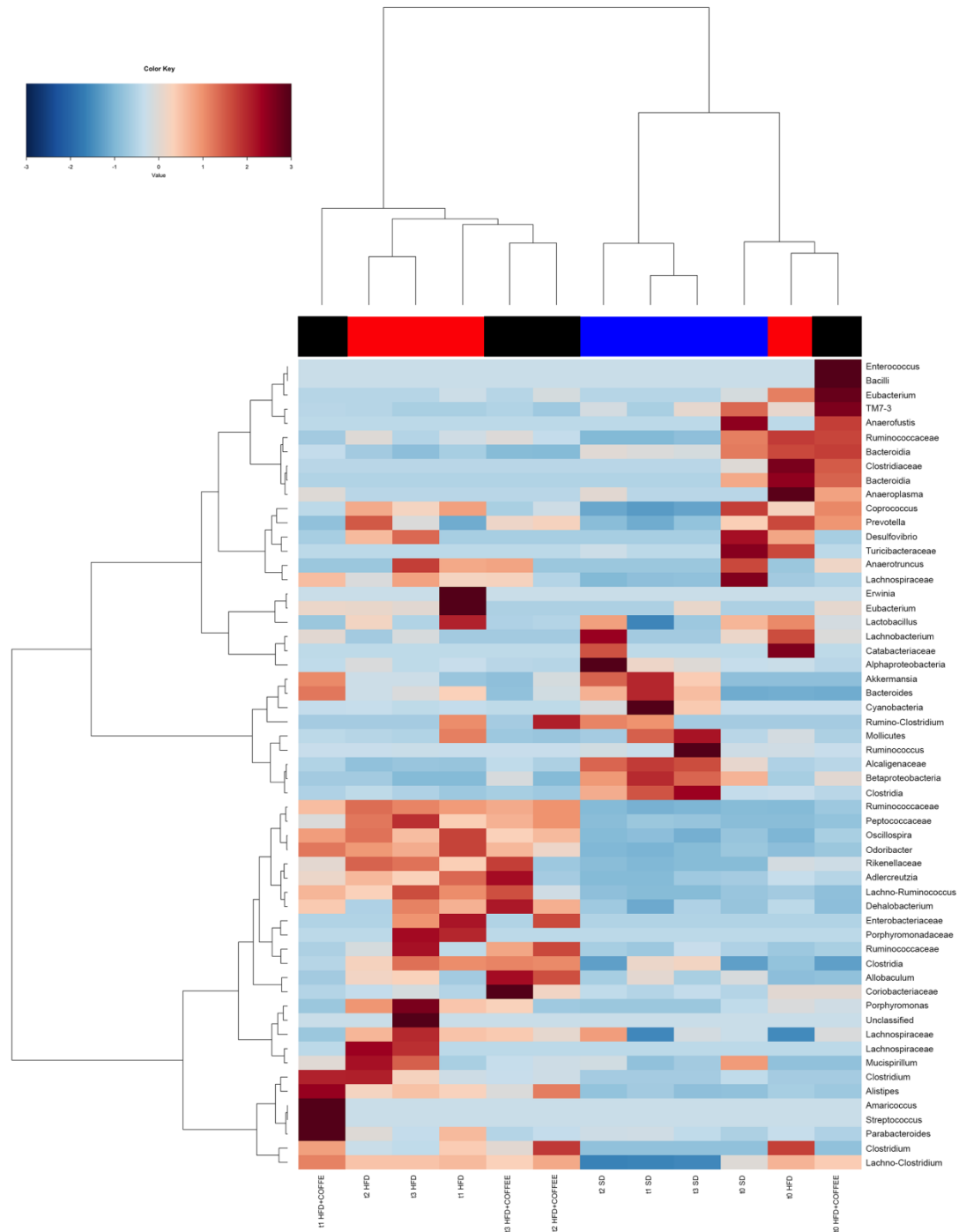
*L'epitelio intestinale è provvisto di giunzioni strette, dette tight junctions, che svolgono una funzione sigillante, ossia uniscono le due cellule adiacenti senza lasciare interstizi, in modo che le molecole idrosolubili non filtrino facilmente tra una cellula e l'altra; se una molecola deve passare dal lume intestinale all'interno dell'organismo o passare da cellula a cellula deve sottostare necessariamente all'azione di vaglio dei dispositivi di controllo della cellula. Le giunzioni strette sigillano lo spazio paracellulare e per il loro assemblaggio hanno bisogno delle giunzioni aderenti. Sono complessi multi-proteici costituiti da proteine integrali di membrana (claudine, occludine e molecole di adesione giunzionale), proteine periferiche di membrana (zonula occludens) e molecole regolatrici come le chinasi. Le claudine (18-27 kDa) sono proteine espresse in maniera tessuto-specifica e una mutazione o una delezione di uno dei membri di questa famiglia può avere notevoli effetti sulla*



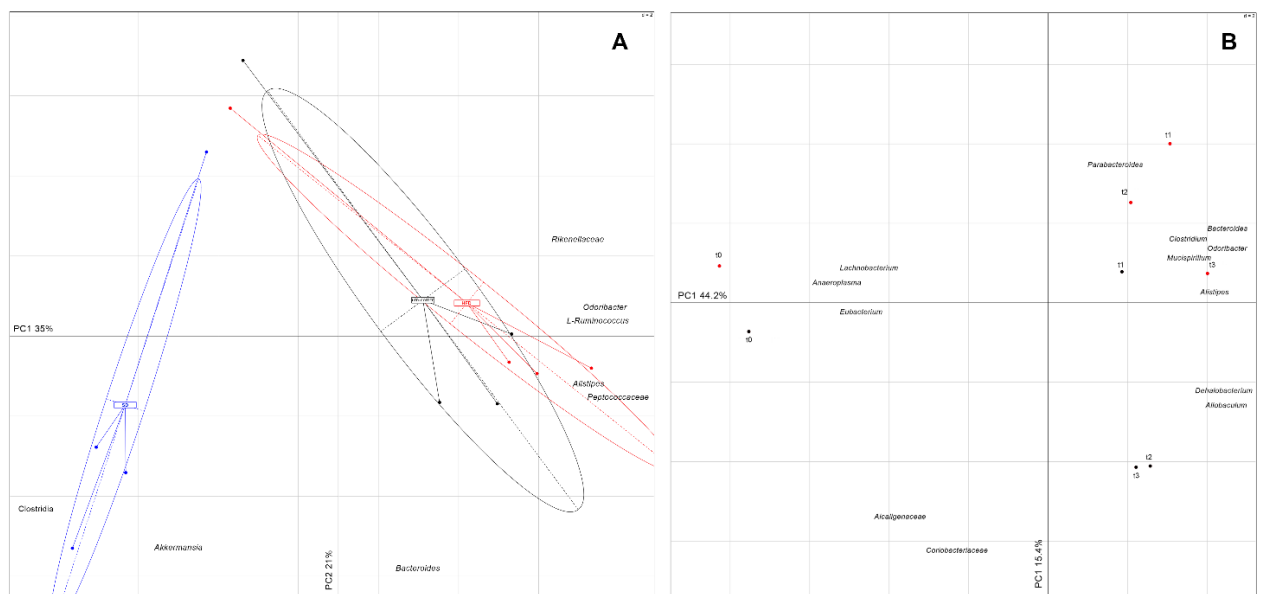
*funzione dell'organo<sup>75,76</sup>. Le claudine sono, inoltre, elementi chiave nella perdita di funzione della barriera durante la carcinogenesi e il processo metastatico<sup>77</sup>. Le occludine (65 kDa) sono proteine il cui dominio C-terminale, localizzato nel citoplasma, si lega direttamente a ZO-1 che a sua volta lega la parte apicale dell'actina. In topi deficienti in occludina sono state osservate alterazioni (infiammazioni croniche o iperplasie) in tutti quei distretti caratterizzati dalla presenza delle TJ suggerendo delle funzioni più complesse da attribuire all'occludina, il cui ruolo non è ancora del tutto noto<sup>78</sup>. Le proteine periferiche di membrana zonula occludens (ZO) sono cruciali per l'assemblaggio e il mantenimento delle TJ poiché possiedono domini multipli per l'interazione con altre proteine, incluse le proteine integrali di membrana e l'actina. Sul lato intracellulare della membrana, le estremità carbossi-terminali di claudina, occludina e actina interagiscono con le proteine ZO-1 (220 kDa), ZO-2 (160 kDa) e ZO-3 (130 kDa). Il complesso multiproteico delle TJ, fino ad ora descritto, è legato al citoscheletro di actina attraverso le proteine ZO che si legano alle proteine integrali di membrana con il dominio N-terminale e al citoscheletro di actina con il dominio C-terminale. La proteina che gioca il ruolo centrale è ZO-1 che direttamente e indirettamente collega le proteine integrali di membrana (occludine e claudine) alle altre proteine citoplasmatiche delle TJ e al citoscheletro di actina.*

Come mostrato in figura 8, il microbiota fecale è fortemente influenzato dalla dieta grassa. In particolare, i livelli di *Alistipes*, *Odoribacter* e *Allobaculum* sono aumentati mentre *Muribaculum* è ridotto in HFD rispetto a SD ( $p < 0,05$ ). È interessante notare che l'assunzione di caffè si associa ad un significativo aumento di *Alcaligenaceae* nei topi nutriti con HFD, indipendentemente dalla durata del trattamento. L'analisi PCA mostra un chiaro raggruppamento dei campioni secondo la dieta (Figura 9, pannello A). Tuttavia, quando l'analisi è stata condotta separatamente su topi HFD o SD, è stato osservato un effetto sull'assunzione di caffè. I campioni dopo 6 e 10 settimane di consumo di caffè (HFD + COFFEE,

Figura 9, pannello B) sono separati dall'HFD. Questa separazione è stata principalmente determinata dalla diversa abbondanza di *Alistipes*, *Bacteroides* e *Odoribacter*.



**Fig. 8: Microbiota intestinale.** Raggruppamento dei campioni del legame gerarchico di Ward in base al coefficiente di correlazione di Pearson per l'abbondanza dei taxa presenti in almeno il 10% dei campioni. La scala dei colori indica l'abbondanza in scala di ciascuna variabile, indicata come Z-score; rosso, alta abbondanza; blu, bassa abbondanza. Le barre delle colonne sono colorate secondo il trattamento dietetico: blu, topi in SD; rosso, topi in HFD; nero, topi in HFD che consumano caffè. I campioni sono codificati in base al tipo di dieta (SD o HFD) e alla durata del trattamento (t0, baseline; t1, 2 settimane; t2, 6 settimane; t3, 10 settimane).



**Fig. 9: Principal Component Analysis (PCA)** basato sul microbiota a livello di genere di tutti i campioni analizzati in questo studio (A) o solo su topi alimentati con HFD (B). I primi due componenti principali sono stati tracciati. Il centro di gravità per ciascun gruppo è contrassegnato da un rettangolo che indica il gruppo di campioni. Solo i taxa con un punteggio di caricamento > 0,5 sono mostrati nella

figura. I campioni sono colorati secondo il trattamento dietetico: blu, topi SD; rosso, topi HFD; nero, topi HFD + COFFEE) e codificati in base alla durata del trattamento (t0, baseline; t1, 2 settimane; t2, 6 settimane; t3, 10 settimane).

I dati hanno mostrato che il microbiota intestinale dei topi HFD era chiaramente diverso da SD (A). Tuttavia, quando si considerano solo topi HFD (che assumono o meno caffè), è stato osservato un certo grado di separazione per i topi trattati con caffè per 6 e 10 settimane, che si raggruppano separatamente da quelli che non bevono caffè (B).

## 6. DISCUSSIONE

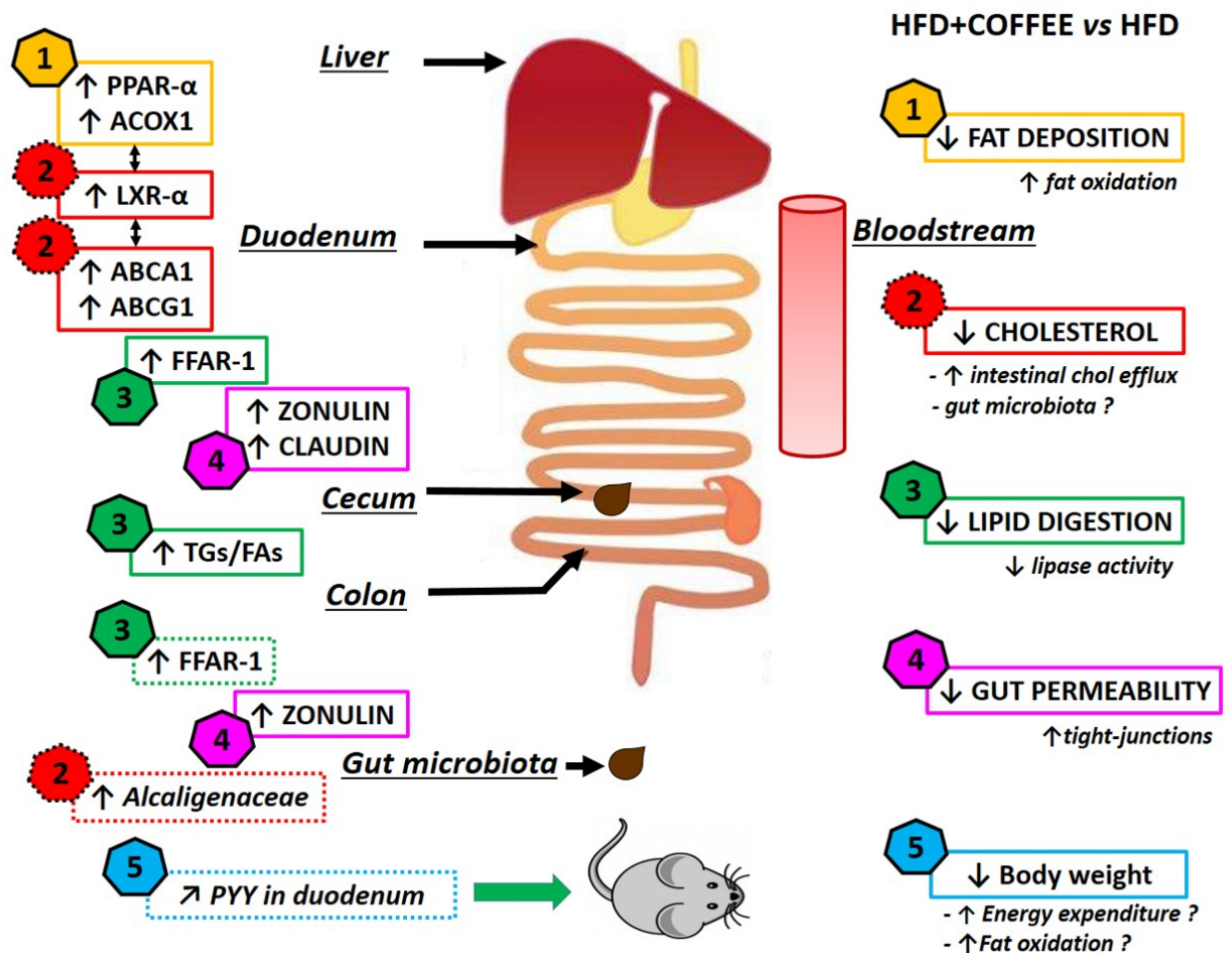
Col presente studio ci siamo proposti di valutare se la supplementazione orale di caffè decaffeinato possa prevenire o migliorare la steatosi epatica indotta sperimentalmente con una dieta iperlipidica in un modello murino. Il modello sperimentale da noi utilizzato simula con buona approssimazione lo stile di vita alimentare prevalente in occidente dove si segue uno stile dietetico con un elevato valore energetico e caratterizzato, in particolar modo, da alimenti ricchi di acidi grassi saturi.

I nostri risultati dimostrano che il consumo di caffè determina<sup>79</sup>:

- 1) riduzione della deposizione di grasso epatico, aumentando l'ossidazione dei grassi nel fegato, come dimostrato dall'aumento della regolazione dell'espressione genica di PPAR- $\alpha$  e ACOX1;
- 2) riduzione del colesterolo circolante attivando l'efflusso di colesterolo intestinale attraverso l'up-regolazione di LXR- $\alpha$  epatico e ABCA1 e ABCG1 intestinali. Questo effetto è stato probabilmente sostenuto dalla maggiore abbondanza di Alcaligenaceae nel microbiota intestinale;
- 3) riduzione della digestione dei lipidi e miglioramento del sistema intestinale coinvolto nel sensing dei lipidi come dimostrato dall'aumento del rapporto tra i trigliceridi e gli acidi grassi liberi presenti nel contenuto di cieco dei topi che bevono caffè, e dall'up-regolazione di FFAR-1 nel duodeno e nel colon;

- 4) riduzione della permeabilità intestinale attraverso il ripristino delle *tight junctions* nel duodeno e nel colon, come dimostrato dall'up-regolazione di zonulina e claudina;
- 5) controllo del peso corporeo eventualmente attraverso l'aumento del *dispendio energetico* e dell'ossidazione dei grassi. Tali condizioni potrebbero essere indotte da un miglioramento del sensing lipidico che potrebbe influenzare la regolazione del metabolismo energetico attraverso il miglioramento della sensibilità all'insulina e una trascurabile up-regolazione del PYY intestinale.

Questi risultati si associano ad un trascurabile cambiamento della composizione del microbiota intestinale.



**Fig. 10: Rappresentazione schematica dei principali risultati di questo studio.**

Nella parte destra dello schema sono elencati cinque effetti del consumo di caffè e i meccanismi dimostrati o ipotizzati (se seguiti da "?") alla base di tali effetti. Nella parte sinistra dello schema sono riportati i percorsi coinvolti in siti specifici del tratto gastro-intestinale. (↑, aumento; ↓, riduzione; ↗, tendenza all'aumento)

Il consumo di caffè riduce la steatosi epatica, indotta da HFD, e i livelli di ALT circolante. La riduzione della deposizione di grasso epatico (come dimostrato dall'istologia e dal ridotto rapporto peso fegato/peso corporeo) e dell'infiammazione, appare in chiave con una maggiore  $\beta$ -ossidazione lipidica<sup>80</sup>, supportata dall'attivazione di PPAR- $\alpha$ . L'attivazione di PPAR- $\alpha$  può produrre diversi effetti tra cui il mantenimento dell'omeostasi lipidica inducendo l'espressione di geni perossisomiali ed enzimi mitocondriali coinvolti nel metabolismo degli acidi grassi<sup>81</sup>. Una attivazione di PPAR- $\alpha$  altera conseguentemente l'espressione di geni appartenenti ai diversi *pathways* ad esso correlati, in particolare enzimi dell'ossidazione degli acidi grassi come ACOX 1, che caratterizza il primo *step* limitante della  $\beta$ -ossidazione lipidica. Ciò è in accordo con altri studi che dimostrano la capacità dei polifenoli, come composti puri o come parte di alimenti, di indurre l'ossidazione lipidica nel fegato di animali alimentati con dieta iperlipidica (HFD)<sup>82</sup>. La up-regolazione di ACOX1 evidenziata nel nostro studio ben si correla, quindi, con l'ipotesi dell'avvenuta  $\beta$ -ossidazione lipidica nel fegato indotta dal caffè.

Diversamente da quanto riportato nel nostro precedente lavoro<sup>46</sup>, il caffè non modula il livello dei trigliceridi sierici, ma riduce il colesterolo e il glucosio nel sangue dei topi alimentati con HFD. Entrambi gli effetti sono mediati dal recettore LXR- $\alpha$  epatico, la cui attivazione è in linea con quella di PPAR- $\alpha$ <sup>83</sup>. I recettori LXR giocano un ruolo fondamentale come regolatori dei livelli di colesterolo plasmatico poiché, avvertendone l'aumento, mettono in atto diversi meccanismi finalizzati alla protezione delle cellule dal sovraccarico di colesterolo. L'attivazione dei recettori LXR determina: 1) la stimolazione della rimozione del colesterolo dalle cellule, il



suo trasporto nel fegato e la successiva secrezione a livello biliare, 2) l'incremento della secrezione del colesterolo da parte delle cellule intestinali nel lume intestinale, 3) l'inibizione della biosintesi del colesterolo e del suo *uptake* da parte delle cellule. Oltre al prominente ruolo svolto nel metabolismo del colesterolo, è stato dimostrato che i recettori LXR regolano la biosintesi degli acidi grassi a livello epatico unitamente all'anabolismo e al catabolismo degli acidi biliari. Tutte queste funzioni hanno il netto risultato di facilitare l'eliminazione del colesterolo dall'organismo. Parimenti, il trasporto inverso del colesterolo (RCT, Reverse Cholesterol Transport) è una via attraverso cui il colesterolo in eccesso è trasportato dai tessuti periferici al fegato dove viene secreto nella bile e successivamente eliminato tramite le feci. Il primo *step* del RCT consiste nella rimozione del colesterolo dai tessuti mediante le HDL (High Density Lipoprotein) o apolipoproteine libere dai grassi come ApoA-I. Questo fondamentale processo è principalmente regolato dai trasportatori ABCA1 e ABCG1, noti target di LXR, in maniera diversa ma sinergica: ABCA1 è responsabile del trasferimento del colesterolo e dei fosfolipidi dalla membrana plasmatica alle pre-HDL o alla apolipoproteina ApoAI, pertanto può essere considerato quale uno dei più importanti fattori nella formazione di HDL provenienti dal fegato e dall'intestino<sup>84,85</sup>, mentre ABCG1 trasferisce il colesterolo a particelle HDL-2 e HDL-3, ma non a ApoA-I povere in lipidi<sup>86,87</sup>.

Una mole sempre più cospicua di studi sostiene che i recettori LXR svolgono un ruolo nella regolazione dell'omeostasi del colesterolo. Invero, risultati ottenuti da diversi gruppi di ricerca hanno dimostrato che il trattamento con agonisti di LXR riduce i livelli plasmatici del glucosio e aumenta la sensibilità nei confronti dell'insulina in numerosi modelli di diabete e di insulino-resistenza. Ciò è stato

attribuito ad una coordinata regolazione trascrizionale dei geni coinvolti nel metabolismo del glucosio sia nel fegato sia nei tessuti extraepatici. Infatti, l'attivazione dei recettori LXR comporta una notevole down-regolazione di enzimi chiave nel processo di gluconeogenesi<sup>88</sup>. Oltre agli effetti sul metabolismo del glucosio a livello del fegato, l'attivazione dei recettori LXR può influenzare anche l'omeostasi del glucosio in altri tessuti, come il tessuto adiposo bianco (WAT, White Adipose Tissue), il muscolo e il pancreas. Ad esempio, nel WAT il trasportatore del glucosio GLUT4 (Glucose Transporter 4) è un target diretto di LXR- $\alpha$ <sup>89</sup>. Si può quindi ipotizzare che l'attivazione di LXR- $\alpha$  può migliorare l'insulino-resistenza stimolando l'*uptake* di glucosio da parte dei tessuti periferici<sup>90</sup>.

A livello intestinale, nei topi che assumono caffè decaffeinato rispetto ai topi che bevono solo acqua, la up-regolazione del recettore degli acidi grassi a lunga catena (LCFA) FFAR-1, potrebbe fornire un'ulteriore spiegazione del meccanismo alla base del metabolismo glucidico. Inoltre, l'attivazione di FFAR-1 induce la risposta della CCK che, a sua volta, può stimolare la secrezione della lipasi pancreatica e l'assorbimento del grasso<sup>91</sup>. È stato, quindi, ipotizzato che la up-regolazione di FFAR-1 fosse un meccanismo adattivo intestinale per compensare la mancanza di digestione dei grassi, causata dall'attività inibitoria dei polifenoli del caffè sulla lipasi pancreatica<sup>92-94</sup>. In chiave con questi risultati, la caratterizzazione lipidica del contenuto di cieco nel nostro modello di studio ha evidenziato un rapporto tra trigliceridi e acidi grassi maggiore nei topi a dieta grassa che assumevano caffè decaffeinato rispetto ai soli HFD. Pertanto, un migliore assorbimento di grasso, conseguente alla up-regolazione di FFAR-1, possibilmente indotto da una aumentata risposta di CCK, potrebbe fornire una spiegazione plausibile per il livello sierico dei

trigliceridi simile nei topi HFD e HFD + COFFEE, sebbene questi ultimi mostrino una ridotta digestione dei grassi.

Il consumo di caffè si associa anche ad una tendenza verso una aumentata espressione genica di PYY duodenale e, in parallelo, una diminuzione del peso corporeo nei topi che avevano assunto una maggior quantità di cibo. Il mancato effetto di PYY nell'indurre la sensazione di sazietà può essere spiegato dal fatto che, in presenza di inibitori della lipasi causata dal caffè, si sarebbe potuta verificare un'attenuazione dell'effetto inibitorio sull'assunzione di cibo<sup>95</sup>. D'altra parte, il minore peso corporeo dei topi che bevono caffè, rispetto agli altri, è in accordo con la capacità di PYY di aumentare il dispendio energetico e il tasso di ossidazione dei grassi<sup>96</sup>. Un altro importante risultato del presente studio riguarda la permeabilità intestinale, migliorata in seguito alla supplementazione di caffè come evidenziato nei topi che assumono caffè rispetto ai soli HFD dal ripristino dell'espressione di ZO-1 nel duodeno e nel colon, e dell'espressione di claudina, nel duodeno<sup>97</sup>. Una migliore funzione di barriera intestinale indotta dal caffè è in linea con la ridotta steatosi epatica e i ridotti livelli sierici di colesterolo e glucosio.

I nostri dati, tuttavia, mostrano che la composizione del microbiota intestinale non è significativamente modificata dal consumo di caffè. È stata, però, riscontrata una maggiore abbondanza di Alcaligenaceae nei topi alimentati con HFD che assumono caffè. Pertanto, si può speculare che tali batteri potrebbero essere implicati nel riassorbimento intestinale del colesterolo, suggerendo un ulteriore meccanismo a monte dell'effetto del caffè sulla riduzione del colesterolo sierico. Una grande abbondanza di Alcaligenaceae è stata osservata anche da Zhou e colleghi<sup>98</sup> in topi

alimentati con farina di avena integrale (WGO) che presentavano un basso livello di colesterolo nel sangue rispetto ai topi alimentati con farina di avena con un basso contenuto di crusca (LBO)<sup>98</sup>. La corrispondenza dei risultati di questo studio con i nostri, potrebbe essere attribuita al fatto che sia il consumo di WGO sia quello di caffè forniscono fibre alimentari antiossidanti; in effetti, la dieta WGO contiene una percentuale di fibre solubili (principalmente  $\beta$ -glucani) dell'1,4% in peso / peso, insieme a sostanze fitochimiche specifiche tra cui acidi fenolici, alchil- e alchenilresorcinoli e avenantramidi, rispetto a LBO. L'estratto di caffè usato nel presente studio contiene melanoidine e polifenoli che si comportano fisiologicamente come fibra alimentare, cioè possono arrivare non digerite al colon e possono essere fermentate dal microbiota locale<sup>99</sup>. Inoltre, poiché le melanoidine intrappolano i polifenoli nella loro struttura, possono essere assimilate alle fibre alimentari cerealicole antiossidanti quali portatori naturali di polifenoli all'intestino distale contribuendo agli effetti del caffè sulla omeostasi del colon e ai benefici metabolici mediati dal microbiota intestinale<sup>44,100</sup>.

Tutti i meccanismi mostrati nel nostro studio supportano i dati epidemiologici relativi al ruolo del caffè nel ridurre la prevalenza e l'incidenza della sindrome metabolica<sup>101</sup>.

## 7. BIBLIOGRAFIA

1. Hyysalo J, Mannisto VT, Zhou Y et al . A population-based study on the prevalence of NASH using scores validated against liver histology. *J Hepatol* 2014;60:839 –846.
2. Ratziu V, Goodman Z, Sanyal A. Current efforts and trends in the treatment of NASH. *J Hepatol* 2015;62(1Suppl):S65-75.
3. Loomba R, Sanyal AJ. The global NAFLD epidemic. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*. 2013;10:686-690.
4. Federico A, Zulli C, de Sio I, Del Prete A, Dallio M, Masarone M, Loguercio C. Focus on emerging drugs for the treatment of patients with non-alcoholic fatty liver disease. *World J Gastroenterol*. 2014 Dec 7;20(45):16841-57.
5. Masarone M, Federico A, Abenavoli L, Loguercio C, Persico M. Non alcoholic fatty liver: epidemiology and natural history. *Rev Recent Clin Trials*. 2014;9(3):126-33.
6. Cortez-Pinto H, De Moura MC, Day CP. Non-alcoholic steatohepatitis: from cell biology to clinical practice. *J Hepatol* 2006;44:197-208.
7. Sanyal AJ. Technical review on nonalcoholic fatty liver disease. *Gastroenterology* 2002 Nov;123(5):1705-25.
8. Marra F, Svegliati-Baroni G.. Lipotoxicity and the gut-liver axis in NASH pathogenesis. *J Hepatol* 2018;68:280-295.

9. Day C, James O. Steat hepatitis: a tale of two “hit”?. *Gastroenterology* 2008;134:1655-69.
10. Anty R, Lemoine M. Liver fibrogenesis and metabolic factors. *Clinics and Research in Hepatology and Gastroenterology* 2011; 35: S10-S20.
11. Paschos P, Paletas K. Non alcoholic fatty liver disease two-hit process: multifactorial character of the second hit. *Hippokratia* 2009, 13, 2: 128.
12. Logan BK, Jones AW. Endogenous ethanol ‘auto-brewery syndrome’ as a drunk-driving defence challenge. *Med Sci Law*. 2000 Jul;40(3):206-15.
13. Raoult D. Obesity pandemics and the modification of digestive bacterial flora. *Eur. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 2008; 27(8), 631 634 .
14. Holines E, Li JY, Athanasion T et al. Understanding the mole of gut microbiome-host metabolic signal disruption in health and disease. *Trends Microbiol.* 2011;19(7), 349-359.
15. Sekirov, Russell SL, Antunes LC et al. Gut microbiota in health and disease. *Physiol. Rep.* 2010; 90(3), 859-904
16. Guamer F, Malagelada JR. Gut flora in health and disease. *The Lancet* 2003; 361: 512-19.
17. Bengmark S. Pre-, pro- and synbiotics. *Curr Opin in Clin Nutr Metab Care* 2001; 4: 571-579.

18. Weisberg S.P., McCann D., Desai M., et al. Obesity is associated with macrophage accumulation in adipose tissue. *J. Clin. Invest.* 2003; 112, 1796-1808.
19. Xu H., Barnes G.T., Yang Q., et al.. Chronic inflammation in fat plays a crucial role in the development of obesity-related insulin resistance. *J. Clin. Invest* 2003;112, 1821-1830.
20. Tordjman J., Guerre-Millo M., & Clement K. Adipose tissue inflammation and liver pathology in human obesity. *Diabetes Metab* 2008; 34, 658-663.
21. Olefsky J.M., & Glass C.K. Macrophages, inflammation, and insulin resistance. *Annu. Rev. Physiol* 2010; 72, 219-246.
22. Kosteli A., Sugaru E., Haemmerle G., et al. Weight loss and lipolysis promote a dynamic immune response in murine adipose tissue. *J. Clin. Invest.* 2010; 120, 3466-3479.)
23. Shi H., Kokoeva M.V., Inouye E., et al.. Links between innate immunity and fatty acid-induced insulin resistance. *J. Clin. Invest.* 2006; 116, 3015-3025.
24. Suganami T., Micea T., Itoh M., et al. Attenuation of obesity-induced adipose tissue inflammation in C3H/HeJ mice carrying a Toll-like receptor 4 mutation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2007; 354, 45-49.
25. Erridge C., & Samani N.J. Saturated fatty acids do not directly stimulate Toll-like receptor signaling. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol* 2009; 29, 1944-1949.

26. Cani P.D., Hoste S., Guiot Y., & Delzenne, N. M. Dietary non-digestible carbohydrates promote Lcell differentiation in the proximal colon of rats. *Br. J. Nutr.* 2007;98, 32-37.
27. Cani P.D., Neyrinck A.M., Lava F., et al. Selective increases of bifidobacteria in gut microflora improve highfat- diet-induced diabetes in mice through a mechanism associated with endotoxaemia. *Diabetologia* 2007;50, 2374-2383.
28. Olefsky J. M. & Glass C. K. Macrophages, inflammation, and insulin resistance. *Anne. Rev. Physiol* 2010;72, 219-246.
29. Federico A, Dallio M, Caprio GG, Ormando VM, Loguercio C. Gut microbiota and the liver. *Minerva Gastroenterol Dietol.* 2017 Dec;63(4):385-398.
30. Giorgio V, Alterio A, Miele L et al. Probiotici e NASH:una overview *Giorn Gastr Epatol Nutr Ped* 2014; Volume VI(1):24-27
31. Miele L,Valenza V, La Torre G, et al. Increased Intestinal Permeability and Tight Junction Alterations in Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *Hepatology* 2009;49: 1877-1887.
32. Mehal WZ. The Gordian Knot of dysbiosis, obesity and NAFLD. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol.* 2013 Nov;10(11):637-44.
33. Federico A, Dallio M, Godos J, Loguercio C, Salomone F. Targeting gut-liver axis for the treatment of nonalcoholic steatohepatitis: translational and clinical evidence. *Transl Res.* 2016 Jan;167(1):116-24.



- 34.** Madara JL. Pathobiology of the intestinal epithelial barrier. *Am. J. Pathol.* 1990; 137: 1273–81
- 35.** Zhao LF, Li H, Han DW. Intestinal endotoxemia and liver diseases. *ShijieHuarenXiaohuaZazhi* 2000; 8 :1145-1149.
- 36.** Bae M, Park YK, Lee JY. Food components with antifibrotic activity and implications in prevention of liver disease. *J Nutr Biochem* 2017;55:1-11.
- 37.** Morisco F, Lembo V, Mazzone G, et al. Coffee and liver health. *J Clin Gastroenterol.* 2014 Nov-Dec;48 Suppl 1:S87-90
- 38.** Go´mez-Ruiz JA, Leake DS, Ames JM. In vitro antioxidant activity of coffee compounds and their metabolites. *J Agric Food Chem.* 2007;55:6962–6969.
- 39.** Trugo L.C. Carbohydrates. In: *Coffee*, 1st edition, Clarke R. J., Macrae, R., eds. Essex: Elsevier Applied Science Publishers; 1985, Vol 1: Chemistry, p. 83.
- 40.** Cabras P, Martelli A. *Chimica degli alimenti*. Padova. Piccin.
- 41.** Spiller MA. The chemical components of coffee. *Prog Clin Biol Res.* 1984;158:91–147.
- 42.** Nicoli M.C., Anese M., Manzocco L., Lerici C.R. Antioxidant properties of coffee brews in relation to the roasting degree, *Lebensm. Wissens. Tech.* 1997, 30, 292–297.

43. Daglia, M., Papetti, A., Gregotti, C., et al. In vitro antioxidant and ex vivo protective activities of green and roasted coffee. *J. Agric. Food Chem.* 2000, 48, 1449–1454
44. Vitaglione P, Fogliano V, Pellegrini N. Coffee, colon function and colorectal cancer. *Food Funct* 2012; 3:916-922.
45. De Filippis F, Vitaglione P, Cuomo R et al.. Dietary interventions to modulate the gut microbiome – how far away are we from precision medicine. *Inflammatory Bowel Diseases* 2018 Sep 15;24(10):2142-2154
46. Vitaglione P, Morisco F, Mazzone G, et al. Coffee reduces liver damage in a rat model of steatohepatitis: the underlying mechanisms and the role of polyphenols and melanoidins. *Hepatology.* 2010 Nov; 52(5):1652-61.
47. Bonita JS, Mandarano M, Shuta D, et al. Coffee and cardiovascular disease: in vitro, cellular, animal, and human studies. *Pharmacol Res* 2007;55:187–198.
48. Furtado KS, Prado MG, Aguiar E, et al. Coffee and caffeine protect against liver injury induced by thioacetamide in male Wistar rats. *Basic Clin Pharmacol Toxicol* 2012;111:339–347.
49. Arauz J, Moreno MG, Cortes-Reynosa P, et al. Coffee attenuates fibrosis by decreasing the expression of TGF- and CTGF in a murine model of liver damage. *J Appl Toxicol.* 2013 Sep;33(9):970-9
50. Yamashita K, Yatsuya H, Toyoshima H, et al. Association of coffee consumption with serum adiponectin, leptin, inflammation, and metabolic markers in Japanese workers: a cross-sectional study. *Nutrition and Diabetes* 2012;2:e33

51. Huber WW, Prustomersky S, Delbanco E, et al. Enhancement of the chemoprotective enzymes glucuronyosyl transferase and glutathione transferase in specific organs of the rat by coffee components kahweol and cafestol. *Arch Toxicol* 2002;76:209–217
52. Kalthoff S, Ehmer U, Freiberg N, et al. Coffee induces expression of glucoronosyltransferase by the aryl hydrocarbon receptor and Nrf2 in liver and stomach. *Gastroenterology* 2010;139: 1699–1710
53. Gressner OA. In the search of the magic bullet. *Gastroenterology* 2010;139: 1453–1457
54. Cavin C, Holzhaeuser D, Scharf G, et al. Cafestol and kahweol, two coffee specific diterpenes with anticarcinogenic activity. *Food Chem Toxicol* 2002;40: 1155–1163.
55. Cardenas C, Quesada AR, Medina MA, et al. Anti-angiogenic and anti-inflammatory properties of kahweol, a coffee diterpene. *PLoS One* 2011;6:e23407
56. Bravi F, Bosetti C, Tavani V, et al. Coffee drinking and hepatocellular carcinoma risk: a meta-analysis. *Hepatology* 2007; 46:430–435.
57. Modi AA, Feld JJ, Park Y, et al. Increased caffeine consumption is associated with reduced hepatic fibrosis. *Hepatology* 2010;51:201–209.
58. Panchal SK, Poudyal H, Waanders J, et al. Coffee extract attenuates changes in cardiovascular function and hepatic structure and function without decreasing obesity in high-carbohydrate, high-fat diet-fed male rats. *J Nutrition* 2012;142: 690–697

59. Birerdinc A, Stepanova M, Pawloski L, Younossi ZM. Caffeine is protective in patients with non-alcoholic fatty liver disease. *Aliment Pharmacol Ther*. 2012 Jan;35(1):76-82.
60. Birerdinc A, Stepanova M, Pawloski L, et al. Caffeine is protective in patients with non-alcoholic fatty liver disease. *Aliment Pharmacol Ther* 2012;35:76–82
61. Shi X, Dalal NS, Jain AC. Antioxidant behavior of caffeine: efficient scavenging of hydroxyl radicals. *Food Chem Toxicol* 1991;29:1–6
62. Anty R, Marjoux S, Iannelli A, et al. Regular coffee but not espresso drinking is protective against fibrosis in a cohort mainly composed of morbidly obese European women with NAFLD undergoing bariatric surgery. *J Hepatol* 2012;57: 1090–1096.
63. Torres DM, Harrison SA. Is it time to write a prescription for coffee? Coffee and liver disease. *Gastroenterology*. 2013 Apr;144(4):670-2.
64. Gregory KE, Bird SS, Gross VS, et al. Method Development for Fecal Lipidomics Profiling. *Anal Chem* 2013;85:1114–1123.
65. Bird SS, Marur VR, Sniatynski MJ et al. Serum Lipidomics Profiling Using LC-MS and High-Energy Collisional Dissociation Fragmentation: Focus on Triglyceride Detection and Characterization. *Anal Chem* 2011; 83:6648–6657.
66. De Filippis F, Pellegrini N, Vannini L et al. High-level adherence to a Mediterranean diet beneficially impacts the gut microbiota and associated metabolome. *Gut* 2016;65:1812–1821.
67. Caporaso JG, Kuczynski J, Stombaugh J et al. QIIME allows analysis of high-throughput community sequencing data. *Nat Methods* 2010; 7:335-336.

68. De Filippis F, Vannini L, La Stora A et al. The same microbiota and a potentially discriminant metabolome in the saliva of omnivore, ovo-lacto-vegetarian and vegan individuals. *PLoS One* 2014; 9:e112373.
69. Love MI, Huber W, Anders S. Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2. *Genome Biol* 2014;15:550.
70. Pawlak M, Lefebvre P, Staels B Molecular mechanism of PPAR $\alpha$  action and its impact on lipid metabolism, inflammation and fibrosis in non-alcoholic fatty liver disease *J Hepatol.* 2015 Mar;62(3):720-33.
71. Venkateswaran A, Laffitte BA, Joseph SB, Mak PA, Wilpitz DC, Edwards PA, Tontonoz P. Control of cellular cholesterol efflux by the nuclear oxysterol receptor LXR  $\alpha$ . *Proc Natl Acad Sci USA.* 2000; 97: 12097-12102.11.
72. Tontonoz P. Transcriptional and posttranscriptional control of cholesterol homeostasis by liver X receptors. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol.* 2011; 76: 129-137
73. Byrne CS, Chambers ES, Morrison DJ & Frost G. The role of short chain fatty acids in appetite regulation and energy homeostasis *International Journal of Obesity* (2015) 39, 1331–1338
74. Moran TH. Gut peptides in the control of food intake. *Int. J. Obes. (Lond).* 2009; 33 Suppl 1:S7-10
75. H. Chiba, M. Osanai, M. Murata, et al. Transmembrane proteins of tight junctions, *Biochimica et biophysica acta* 1778 (2008) 588-600.
76. L. Paris, L. Tonutti, C. Vannini, G. Bazzoni, Structural organization of the tight junctions, *Biochimica et biophysica acta* 1778 (2008) 646-659.

77. T.A. Martin, W.G. Jiang, Loss of tight junction barrier function and its role in cancer metastasis, *Biochimica et biophysica acta* 1788 (2009) 872- 891.
78. M. Saitou, M. Furuse, H. Sasaki, et al. Complex phenotype of mice lacking occludin, a component of tight junction strands, *Molecular biology of the cell* 11 (2000) 4131-4142.
79. Vitaglione P, Mazzone G, Lembo V, D'Argenio G, Rossi A et al. Coffee prevents fatty liver disease induced by a high-fat diet by modulating pathways of the gut–liver axis. *Journal of Nutritional Science* (2019), doi:10.1017/jns.2019.10
80. Souza-Mello V. Peroxisome proliferator-activated receptors as targets to treat non-alcoholic fatty liver disease. *World J Hepatol* 2015; 7: 1012–1019
81. Berger et al. 2002
82. Salomone F, Godos J, Zelber-Sagi S. Natural antioxidants for non-alcoholic fatty liver disease: molecular targets and clinical perspectives. *Liver Int.* 2016; 36:5-20.
83. Li AC, Glass CK. PPAR- and LXR-dependent pathways controlling lipid metabolism and the development of atherosclerosis. *J Lipid Res* 2004;45:2161-73.
84. Brunham LR, Kruit JK, Iqbal J et al. Intestinal ABCA1 directly contributes to HDL biogenesis in vivo. *J Clin Invest* 2006;116(4):1052-62.
85. Lo SG, Murzilli S, Salvatore L et al. Intestinal specific LXR activation stimulates reverse cholesterol transport and protects from atherosclerosis. *Cell Metab* 2010;12(2):187-93

- 86.** Kennedy MA, Barrera GC, Nakamura K et al. ABCG1 has a critical role in mediating cholesterol efflux to HDL and preventing cellular lipid accumulation. *Cell Metab* 2005;1(2):121-31.
- 87.** Sabol SL, Brewer HB, Jr., Santamarina-Fojo S. The human ABCG1 gene: identification of LXR response elements that modulate expression in macrophages and liver. *J Lipid Res* 2005;46(10):2151-67.
- 88.** Grempler R, Gunther S, Steffensen KR et al. Evidence for an indirect transcriptional regulation of glucose-6-phosphatase gene expression by liver X receptors. *Biochem Biophys Res Commun* 2005;338(2):981-6.
- 89.** Dalen KT, Ulven SM, Bamberg K et al. Expression of the insulin-responsive glucose transporter GLUT4 in adipocytes is dependent on liver X receptor alpha. *J Biol Chem* 2003;278(48):48283-91
- 90.** Laffitte BA, Chao LC, Li J et al. Activation of liver X receptor improves glucose tolerance through coordinate regulation of glucose metabolism in liver and adipose tissue. *Proc Natl Acad Sci U.S.A* 2003;100:5419–5424
- 91.** Lo CM, King A, Samuelson LC, et al. Cholecystokinin knockout mice are resistant to high-fat diet-induced obesity. *Gastroenterology* 2010;138:1997-2005.
- 92.** Cha KH, Song DG, Kim SM et al. Inhibition of gastrointestinal lipolysis by green tea, coffee, and gomchui (*Ligularia fischeri*) tea polyphenols during simulated digestion. *J Agric Food Chem.*2012; 60:7152-7157.

- 93.** Murase T, Yokoi Y, Misawa K et al. Coffee polyphenols modulate whole-body substrate oxidation and suppress postprandial hyperglycaemia, hyperinsulinaemia and hyperlipidaemia. *Br J Nutr* 2012; 107:1757-65.
- 94.** Almoosawi S, McDougall GJ, Fyfe L. Investigating the inhibitory activity of green coffee and cacao bean extracts on pancreatic lipase. *Nutr Bull* 2010; 35:207–212.
- 95.** O'Donovan D, Feinle-Bisset C, Wishart J. Lipase inhibition attenuates the acute inhibitory effects of oral fat on food intake in healthy subjects. *Br J Nutr* 2003; 90:849-52.
- 96.** Guo Y, Ma L, Enriori PJ. Physiological evidence for the involvement of peptide YY in the regulation of energy homeostasis in humans. *Obesity (Silver Spring)* 2006; 14:1562–1570.
- 97.** Mazzone G, Lembo V, D'Argenio G, Vitaglione P, Rossi A et al. Decaffeinated coffee consumption induces expression of tight junction proteins in high fat diet fed rats. *Functional Foods in Health and Disease* 2016; 6(9): 602-611
- 98.** Zhou AL, Hergert N, Rompato G et al. Whole grain oats improve insulin sensitivity and plasma cholesterol profile and modify gut microbiota composition in C57BL/6J mice. *J Nutr* 2015;145:222-230
- 99.** Morales FJ, Somoza V, Fogliano V. Physiological relevance of dietary melanoidins. *Amino Acids* 2012; 42:1097–1109.



- 100.** Vitaglione P, Napolitano A, Fogliano V. Cereal dietary fibre: a natural functional ingredient to deliver phenolic compounds into the gut. *Trends Food Sci Technol* 2008;19:451–463.
- 101.** Marventano S, Salomone F, Godos J, et al. Coffee and tea consumption in relation with non-alcoholic fatty liver and metabolic syndrome: A systematic review and meta-analysis of observational studies. *Clin Nutr* 2016; 35:1269-1281.